

**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE “RAFAEL RANGEL”
GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN MICOLOGÍA MÉDICA**

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ACEITE DE GIRASOL
OZONIZADO EN HONGOS CAUSALES DE MICOSIS SUPERFICIALES**

**Autora: Lcda. Karla González
Tutora: MSc. Mireya Mendoza**

CARACAS, NOVIEMBRE 2016

**República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica**

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ACEITE DE GIRASOL
OZONIZADO EN HONGOS CAUSALES DE MICOSIS SUPERFICIALES**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA**

**Autora: Lcda. Karla González
Tutora: MSc. Mireya Mendoza**

CARACAS, NOVIEMBRE 2016

CONSTANCIA

En mi carácter de Tutora del Trabajo Especial de grado titulado “Actividad antifúngica *in vitro* de aceite de girasol ozonizado en hongos causales de micosis superficiales” presentado por la ciudadana Karla Andreina González Juárez para optar al Grado de Especialista en Micología Médica, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser evaluado por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Caracas, a los 17 días del mes de octubre de 2016.

Mireya Mendoza

C.I. 5.314.793

**República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica**

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ACEITE DE GIRASOL
OZONIZADO EN HONGOS CAUSALES DE MICOSIS SUPERFICIALES**

Autora: Karla González

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA**

Noviembre, 2016

APROBADO:

Giuseppe Ferrara

Maribel Dolande

Mireya Mendoza

ACEPTADO:

Gladys González

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios padre todo poderoso por darme la vida y permitirme estar aquí.

A mi madre por su apoyo incondicional.

A mi tutora Mireya Mendoza por ser mi guía en todo momento tanto científica como espiritual. A los profesores Diodoro Iacocca y Marco Canciani, por haber facilitado las muestras objeto del presente estudio y por su valioso aporte científico.

Al personal del laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” Elsi Casares, Maria Elena Rico y Primavera Alvarado por toda la colaboración que brindaron. Al personal del área de lavado y esterilización de material, especialmente al Dr. Raul Ruiz.

Al profesorado del postgrado en Micología Médica del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”: Coordinadora MSc. María Mercedes Panizo, MSc. Maribel Dolande, MSc. Giuseppe Ferrara, MSc. Victor Alarcón, MSc. Nathaly García, Dra. Trina Navas, Dra. Ángela Ruiz, Prof. Wilfredo. Sin ustedes esto no sería posible.

A mis compañeras del postgrado Annette, Mariale, Jocays y Emilia, por su amistad y por permitir formar un equipo tan especial y unido.

Al Dr. José Luis Rodríguez, Jefe del laboratorio de Bacteriología del Hospital Vargas de Caracas por colaborar con los permisos que requerí en la culminación de este trabajo así como en la realización del postgrado.

A la Lcda. Priscécil Andarcia y Lcda. Hilda Morón Jefes de del laboratorio de la Clínica Santa Sofía.

A todos ustedes y los que haya pasado por alto en esta nota, mi más sincero y profundo agradecimiento.

DEDICATORIA

Dedicado a las personas que sueñan y trabajan cada día por un futuro mejor,
por una Venezuela llena de oportunidades.

ÍNDICE

	Página
Título, Autor, Tutor	ii
Constancia de aceptación del tutor	iii
Aprobación del jurado	iv
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
Índice General	vii
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
Introducción	1
Marco Teórico	4
Objetivos: general y específicos	15
Metodología	16
Resultados	33
Discusión	54
Conclusiones	61
Recomendaciones	62
Referencias bibliográficas	63
Anexos	70

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Microorganismos fúngicos utilizados para ensayos de actividad antifúngica frente a compuestos ozonizados.	17
Tabla 2. Compuestos ozonizados ensayados.	20
Tabla 3. Condiciones de cultivo de las cepas y los aislados para los ensayos de sensibilización <i>in vitro</i> .	24
Tabla 4. Concentraciones ensayadas de AGO y de los antifúngicos comerciales de acuerdo a los hongos a evaluar.	28
Tabla 5. Tiempo de incubación de las placas de microdilución en caldo.	30
Tabla 6. Porcentajes de viabilidad obtenidos con la cepa ATCC 90028 <i>Candida albicans</i> frente a los compuestos ozonizados a diferentes tiempos de exposición.	36
Tabla 7. Tiempos de letalidad obtenidos con la cepa ATCC 90028 <i>Candida albicans</i> frente a los compuestos ozonizados.	37
Tabla 8. Tiempo fungicida y tasa de letalidad de los compuestos ozonizados frente a la cepa ATCC 90028 <i>C. albicans</i> .	40

Tabla 9. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M27-A3 del CLSI para los aislados de <i>Candida albicans</i> y cepas control frente al compuesto ozonizado y aceite sin ozonizar.	42
Tabla 10. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los aislados clínicos de diferentes especies de <i>Fusarium</i> frente al compuesto ozonizado.	44
Tabla 11. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los aislados de <i>Microsporium canis</i> frente al compuesto D ozonizado y aceite de girasol sin ozonizar.	45
Tabla 12. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los aislados de <i>Trichophyton rubrum</i> frente al compuesto D ozonizado y aceite de girasol sin ozonizar.	46
Tabla 13. Rango de las CIM y CFM del aceite de girasol ozonizado y sin ozonizar frente a los microorganismos ensayados.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras químicas representativas de ácidos grasos ozonizados.	10
Figura 2. Actividad antifúngica de las fracciones acuosa y oleosa del compuesto D con la cepa ATCC 90028 <i>C. albicans</i> .	35
Figura 3. Curvas de letalidad de diferentes compuestos ozonizados frente a la cepa ATCC 90028 <i>Candida albicans</i> .	39
Figura 4. Valores máximos de CIM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI de los microorganismos ensayados frente a la porción oleosa y acuosa ozonizada de la muestra D y el control.	49
Figura 5. Valores máximos de CFM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI de los microorganismos ensayados frente a la porción oleosa y acuosa ozonizada de la muestra D y el control	49
Figura 6. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción oleosa del compuesto D frente a dos aislados de <i>Candida albicans</i> .	51
Figura 7. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción oleosa del compuesto D frente a dos aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> .	51

Figura 8. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción acuosa del compuesto D frente a dos aislados de *Microsporum canis*.

52

Figura 9. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción acuosa del compuesto D frente a dos aislados de *Trichophyton rubrum*.

52

**INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE “RAFAEL RANGEL”
GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN MICOLOGÍA MÉDICA**

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ACEITE DE GIRASOL
OZONIZADO EN HONGOS CAUSALES DE MICOSIS SUPERFICIALES**

Autor: Lcda. Karla González
Tutor: MSc. Mireya Mendoza

RESUMEN

Las micosis superficiales son infecciones causadas por hongos que afectan la parte más superficial de la piel, mucosa, pelos y uñas. En los últimos años no se han creado nuevas drogas para el tratamiento de estas micosis. Por lo que es necesario investigar y desarrollar nuevos compuestos con actividad antifúngica. El aceite de girasol ozonizado, que aún está en estudio, representa una posible alternativa. Se planteó el objetivo de evaluar actividad antifúngica *in vitro* del aceite de girasol ozonizado en aislados clínicos de micosis superficiales. Se recopilaron cultivos de *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium* spp., los cuales fueron ensayados para determinar su sensibilidad frente al aceite de girasol ozonizado, que consta de una fase oleosa y otra acuosa, empleando el método de referencia por microdilución en caldo según el CLSI y el método de unidades formadoras de colonias. Los datos obtenidos fueron analizados en base a valores numéricos y medidas de tendencia central. Las comparaciones se llevaron a cabo por la prueba estadística U de Mann-Whitney para análisis de variables no paramétricas. Por el método de unidades formadoras de colonias empleando la cepa de *C. albicans* ATCC90028 se obtuvieron tiempos de letalidad entre 15 y 60 minutos de exposición a las muestras ozonizadas. Por el método de microdilución en caldo se obtuvieron CIM de 0,4% – 0,75% para *C. albicans*; entre 0,75% y 1,5% para *Fusarium* spp., frente al aceite de girasol ozonizado. Frente a la fracción acuosa ozonizada se obtuvieron CIM entre 1,5% y 6,25% para *C. albicans*, entre 0,4% y 1,5% para *Fusarium* spp. Para los dermatofitos, las CIM y CFM frente a la porción acuosa ozonizada fueron $\leq 0,2\%$ y $\leq 0,75\%$. Se concluye que el aceite de girasol ozonizado, tanto en su fracción oleosa como acuosa, tiene mayor actividad antifúngica que el aceite de girasol virgen.

Palabras claves: aceite de girasol ozonizado, micosis superficiales, tratamientos alternativos, dermatofitos, *Fusarium* spp., *Candida* spp.

**INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE “RAFAEL RANGEL”
GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN MICOLOGÍA MÉDICA**

***In vitro* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF OZONIZED SUNFLOWER OIL IN
CAUSATIVE FUNGI OF SUPERFICIAL MYCOSES**

Autor: Lcda. Karla González
Tutor: MSc. Mireya Mendoza

ABSTRACT

Superficial fungal infections are caused by fungus that affect the most superficial part of the skin, mucosa, hair and nails. In recent years there have not created new drugs to treat these fungal infections. So it is necessary to research and develop new compounds with antifungal activity. Ozonated sunflower oil, which is still under study, represents a possible alternative. In order to evaluate *in vitro* antifungal activity of ozonized sunflower oil in clinical isolates of superficial mycosis, it was raised cultures of *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium* spp., which were tested for their sensitivity to ozonized sunflower oil, consisting of an oil phase and another aqueous was collected using the reference method microdilution CLSI broth according to the method and the colony forming units. The data obtained were analyzed based on numerical values and measures of central tendency. Comparisons were carried out by the statistical U Mann-Whitney test for nonparametric analysis variables. By the method of colony forming units using strain *C. albicans* ATCC90028 lethality times were obtained between 15 and 60 minutes of exposure to ozonized samples. By the method of microdilution, MICs there were obtained 0.4% - 0.75% for *C. albicans*; between 0.75% and 1.5% for *Fusarium* spp., against ozonized sunflower oil. Opposite the ozonized aqueous fraction was obtained MIC between 1.5% and 6.25% for *C. albicans*, from 0.4% to 1.5% for *Fusarium* spp. For dermatophytes, MIC and MFC against the ozonized aqueous portion were $\leq 0.2\%$ and $\leq 0.75\%$. It is concluded that ozonized sunflower oil, both aqueous and oil fractions has antifungal activity greater than virgin sunflower oil.

Keywords: ozonized sunflower oil, superficial mycoses, alternative treatments, dermatophytes, *Fusarium* spp., *Candida* spp.

INTRODUCCIÓN

Las micosis superficiales son causadas principalmente por un grupo de hongos queratinofílicos, denominados dermatofitos, que constituyen los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, donde *Trichophyton rubrum* es la especie antropofílica que se aísla con mayor frecuencia a nivel mundial. También en dichas micosis pueden estar implicados hongos no dermatofitos, como las levaduras, principalmente las del género *Candida*, así como hongos filamentosos [1].

El tratamiento de las micosis superficiales depende del tipo y de la localización de la lesión, así como del agente causal. Algunas de ellas, como las onicomycosis, requieren de terapias prolongadas y de administración de fármacos tanto por vía oral como tópica [2,3].

De acuerdo a la información revisada, en los últimos años no se han creado nuevas drogas antifúngicas para el tratamiento efectivo de estas micosis. La resistencia antifúngica en dermatofitos no es frecuente; sin embargo, se encuentran reportes de respuesta refractaria al tratamiento de elección en infecciones por *T. rubrum* [4-7].

En este sentido, es importante investigar y desarrollar nuevos fármacos antifúngicos, en pro de ampliar las opciones terapéuticas efectivas en el tratamiento de estas micosis. Para ello se emplean diferentes técnicas que permitan evaluar la actividad antifúngica *in vitro* frente a nuevos compuestos,

como los fitoquímicos, que son compuestos químicos obtenidos principalmente de plantas [8].

Dentro de los compuestos en estudio con actividad antifúngica se tienen aquellos derivados de plantas medicinales, tales como eucalipto, granada, tomillo morado, clavo de olor, pimienta, entre otros, los cuales continúan en estudio y no son prescritos, ya que, no se conoce con exactitud el principio activo, el mecanismo de acción y los efectos adversos que ellos puedan tener en el ser humano [9-13].

Otros compuesto que está en estudio es el *ajoene*. Se trata de una molécula con actividad antifúngica presente en *Allium sativum*, “ajo”, cuyo mecanismo de acción se atribuye a la inhibición de síntesis de fosfatidil colina, con acumulación del compuesto precursor fosfatidil etanolamina. Se interpreta que este mecanismo ocasiona alteración a nivel de la membrana celular y consiguiente muerte fúngica. Esta molécula continúa en estudio, a pesar de que se han obtenido buenos resultados *in vivo* e *in vitro* [14-16].

Una alternativa actual, en estudio, es la ozonización de compuestos ricos en ácidos grasos insaturados, como el aceite de girasol. Las sustancias oxigenadas que se sintetizan han demostrado tener una buena respuesta *in vitro* e *in vivo* en micosis superficiales con escasos efectos adversos [8, 17-22], ofreciendo así, una posible opción útil para estos compuestos en el ámbito de la medicina.

Existen pocos estudios publicados a nivel mundial sobre actividad antifúngica de los aceites ozonizados. En Latinoamérica, existen publicaciones procedentes de Chile, Brasil y Cuba [8, 21, 18]. Los resultados que se presentan en la mayoría de ellas se refieren al aceite de girasol ozonizado, siendo el girasol (*Helianthus annuus*) una planta herbácea anual de la familia *Asteraceae*, originaria de América y cultivada como alimenticia, oleaginosa y ornamental en todo el mundo; otros nombres comunes son calom, maravilla, maíz de teja, flor de escudo, entre otros. En nuestro país no hay publicaciones relacionadas específicamente con el aceite de girasol. Por tales motivos se considera necesario emprender estudios que permitan estandarizar tanto la preparación del compuesto, como las pruebas de susceptibilidad.

A lo largo de este trabajo se presentarán algunos de los estudios más relevantes publicados sobre el aceite ozonizado y su actividad antimicrobiana, su posible modo de acción y los beneficios que hasta ahora han resultado positivos en el tratamiento de varias enfermedades.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

Existen pocos trabajos publicados sobre actividad antifúngica *in vitro* de aceites ozonizados. A continuación se describen brevemente algunos de ellos, entre los más relevantes.

En el año 2006 Geweely publicó un estudio en Giza, Egipto, sobre actividad antifúngica de aceite de oliva ozonizado en el complejo *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* y complejo *Trichophyton rubrum*, donde se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del compuesto para estos agentes empleando el método de dilución en agar. El aceite ozonizado mostró actividad frente a todos los microorganismos ensayados, con una CIM entre 0,53 y 2,00 mg/mL, siendo las especies más susceptibles *C. albicans*, *M. canis* y *T. rubrum* [20].

En 2012 Guerrer y colaboradores realizaron un estudio en Brasil sobre actividad antifúngica de aceite de girasol ozonizado en levaduras aisladas de onicomicosis, empleando el método de difusión en disco. El compuesto fue activo frente a varias especies de levaduras: complejo *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *Trichosporon asahii*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*, sin embargo, los halos de inhibición que obtuvieron para el aceite de girasol ozonizado fueron menores a los halos que se obtuvieron con los antifúngicos control (fluconazol, ketoconazol, itraconazol y anfotericina B). Los autores comentan

sobre la necesidad de ampliar estudios de sensibilidad del aceite ozonizado por el método de microdilución en caldo, el cual es un método de referencia, a diferencia del método de difusión en disco que ellos emplearon [21].

Ese mismo año fue publicado en Chile un estudio realizado por Thomson y colaboradores, en el cual evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de aceite de girasol ozonizado en 41 cepas de dermatofitos empleando dos métodos, a saber: microdilución en caldo y el de difusión en disco. También evaluaron el nivel de seguridad del compuesto mediante ensayos *in vivo* con ratones de experimentación. Como resultado obtuvieron que el compuesto fue activo frente a todos los dermatofitos por ellos evaluados [8].

Dermatomicosis

Las micosis superficiales se denominan en general dermatomicosis y se dividen inicialmente en dos grandes grupos, de acuerdo al tipo de agente causal a saber: las dermatofitosis, causadas por hongos dermatofitos, y aquellas que son causadas por hongos no dermatofitos [23].

Las dermatofitosis son infecciones debidas a un grupo de hongos queratinofílicos, denominados dermatofitos, que pueden invadir cabello, uña y piel lampiña, tanto en el ser humano como en animales. Esta capacidad se debe a la producción de enzimas, como la queratinasa, que le van a facilitar al hongo la invasión de estos tejidos. Se han descrito unas 40 especies de dermatofitos, dónde aproximadamente 20 están relacionadas con infección en

el ser humano. Su distribución es mundial, aunque determinadas especies se aíslan en regiones bien delimitadas, que sin embargo, el turismo y la inmigración han influido en esta distribución. Se estima que causan entre el 20 y el 25% de las micosis superficiales [23].

Los dermatofitos, como todo microorganismo, poseen características biológicas, que algunas de ellas representan puntos críticos a la hora de escoger las técnicas a emplear en la determinación de actividad antifúngica o pruebas de susceptibilidad. Taxonómicamente los dermatofitos son un grupo de hongos pertenecientes a la división *Ascomycota*, orden *Onygenales*, familia *Arthrodermataceae*; se reproducen por conidias: macro y/o microconidias de formas y cantidad variables, dependiendo del género y la especie. Están comprendidos en tres géneros: *Trichosporum*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Para su cultivo en el laboratorio, pueden tardar entre siete y catorce días para crecer en medios de cultivo micológicos convencionales. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 28°C [24].

Dentro de las infecciones no dermatofíticas se pueden mencionar la pitiriasis versicolor, causada por diferentes especies de *Malassezia*, las onicomycosis causadas por hongos levaduriformes como *Candida* spp. y *Trichosporon* spp., y diferentes hongos filamentosos como especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scopularopsis*, entre otros, que por ser hongos saprofitos, su diagnóstico definitivo se debe hacer por correlación entre el examen directo y el cultivo, más la clínica. La mayoría de las onicomycosis se presentan en

personas adultas, en uñas de los pies, excepto las infecciones por *Candida* spp., que se asocia principalmente a infección en las uñas de las manos en personas que mantienen mucha humedad en las mismas, como lavanderas, pudiendo presentarse paroniquia o inflamación de los bordes laterales del lecho ungueal [25].

Abordaje actual de las dermatomicosis

El manejo adecuado de las dermatomicosis tiene como punto clave realizar un adecuado diagnóstico, que se logra con hacer una buena anamnesis del paciente, donde es de vital importancia los datos epidemiológicos como el contacto con animales, otras personas con las mismas lesiones, la ocupación, enfermedad base, entre otros aspectos que orientan al diagnóstico. Seguidamente se visualizan las lesiones sugestivas y se debe realizar el examen directo con KOH y cultivo de dichas lesiones. La visualización directa de las estructuras fúngicas es orientativo y el cultivo va a permitir hacer el diagnóstico micológico definitivo para la aplicación del tratamiento [24].

Luego de realizar un adecuado diagnóstico se procede a la instauración del tratamiento, el cual va a depender de la presentación clínica. Si se trata de *Tinea corporis* poco extensa se debe tratar con antifúngicos tópicos únicamente. En caso de afecciones extensas o afección de uñas o pelos, el tratamiento debe ser tanto tópico como sistémico. Dentro de los antimicóticos disponibles en el mercado para el tratamiento de las micosis superficiales se encuentran griseofulvina, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina y

ketoconazol, el cual se usa en esquemas específicos bajo estricta vigilancia médica por su elevada hepatotoxicidad [24].

Nuevos compuestos naturales con actividad anti dermatofítica

Desde la antigüedad se han utilizado las plantas por sus propiedades medicinales. Sus estudios a nivel farmacológico son bastante numerosos. Las plantas representan una rica fuente de agentes antimicrobianos y en la naturaleza las mismas tienen sus propias defensas contra hongos que son posibles patógenos para ellas. El creciente número de infecciones micóticas y la disminución de opciones terapéuticas por el aumento de resistencia antifúngica ha estimulado ampliar las investigaciones en actividad antifúngica de diferentes compuestos fitoquímicos [13, 26].

En la actualidad existen numerosos compuestos naturales descritos con actividad antifúngica contra dermatofitos. Entre ellos se pueden mencionar extractos alcohólicos, aceites esenciales y compuestos de naturaleza sulfhídrica aislados de los bulbos de ajos (*Allium sativum*); aceites derivados de *Eucalyptus globosus* y otros extractos alcohólicos de plantas silvestres tales como las imidas cíclicas y leguminosas; sin embargo, ninguno tiene suficientes estudios adecuados que permita el uso en humanos [8, 27].

En este punto conviene señalar que se encuentra en estudio la ozonización de aceites vegetales. Los aceites ozonizados han mostrado tener actividad antifúngica en ensayos preclínicos [8, 20, 21] y aceleran la mejoría clínica en

los pacientes con micosis superficiales como pie de atleta y onicomicosis [18, 22, 28]. Dentro de los aceites ozonizados más estudiados se encuentran el aceite de oliva, el aceite de palma y aceite de girasol, este último por su alto contenido en ácido oleico y linoleico [8, 21].

En ensayos *in vitro* los aceites ozonizados han mostrado un amplio espectro antimicrobiano en hongos, como especies del género *Candida*, *Aspergillus* y dermatofitos [8, 20], en diferentes especies de micobacterias de crecimiento lento y de crecimiento rápido, así como en bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* [29, 30].

Propiedades físicas y químicas de los aceites ozonizados

Para la formación de estos compuestos se emplean sustratos lipídicos insaturados, los cuales reaccionan con una mezcla de gases insuflados de O_2/O_3 , confiriéndole actividad terapéutica a los derivados ozonizados [17] (ver figura 1).

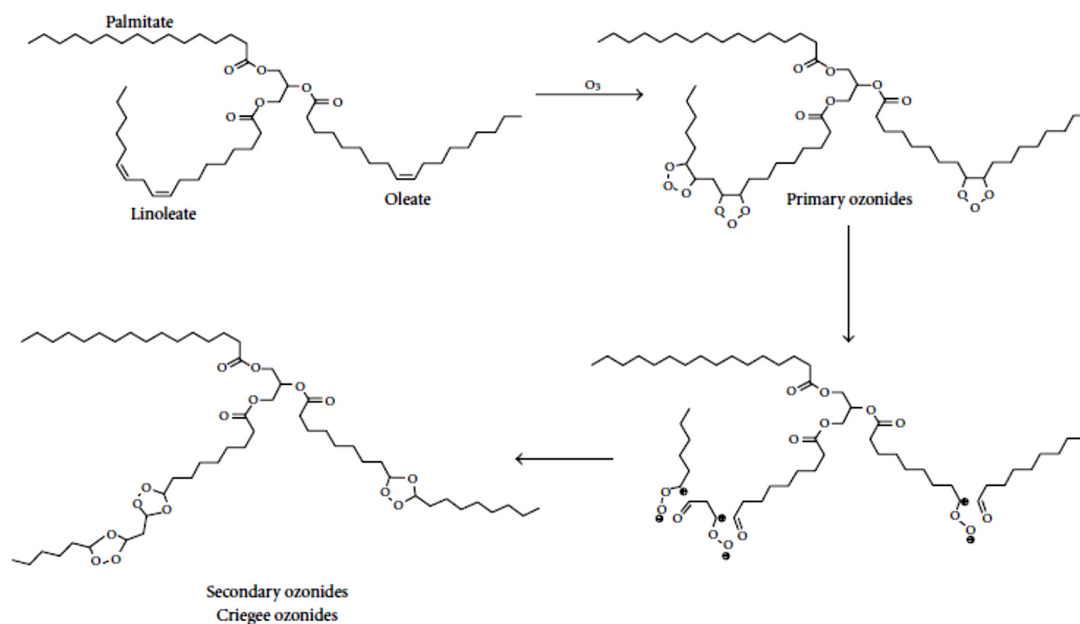


Figura 1. Estructuras químicas representativas de derivados ozonizados que se forman por reacción química del ozono con triglicéridos insaturados. Los ozónidos primarios son especies transitorias, inestables, que se reorganizan en ozónidos secundarios, más estables, también conocidos como ozónidos Criegee [17].

El mecanismo propuesto por el cual se originan estas moléculas, conocido como reacción Criegee, consiste en que el ozono se combina con un enlace insaturado para formar inicialmente un ozónido primario, inestable, que se descompone fácilmente para formar un zwitterión y un fragmento carbonilo. El zwitterión (del alemán zwitter “híbrido”), es un compuesto químico que es eléctricamente neutro pero tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes y se caracterizan por presentar una elevada solubilidad en agua. En un ambiente anhídrido estos sustratos se combinan para dar el típico derivado trioxolano cíclico [17].

Desde el punto de vista de aplicación a nivel industrial, la calidad de los derivados ozonizados depende de varios parámetros, tales como: (i) el tipo y calidad del generador de ozono; (ii) las condiciones de ozonificación, en cuanto a reactores y tiempo, tipo de material y cantidad; (iii) La eficacia del ozonizador [17].

Pruebas para determinar susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas para determinar actividad inhibitoria de los antimicrobianos, están ideadas para aquellos microorganismos con la capacidad de crecer adecuadamente cuando son incubados durante un lapso aproximado de 24 horas. Los microorganismos con requerimientos nutricionales especiales, que crecen más lento o necesitan suplementos nutricionales atmosféricos, deben ser evaluados por pruebas de dilución solo cuando el uso de cepas control demuestra la ausencia de inhibición por interferentes [31]. Dentro de las

técnicas que permiten evaluar actividad inhibitoria de los antimicrobianos tenemos: i) macro y microdilución en caldo, teniendo ventaja el método de microdilución en caldo ya que se utilizan pequeños volúmenes de reactivos. Ambos métodos representa el estándar de oro en cuanto a pruebas de susceptibilidad; ii) Dilución en agar, el cual es el segundo método de referencia iii) Difusión con discos, conocido como prueba de Bauer-Kirby, modificada por el CLSI, ofrece información útil en muchos casos. Sin embargo, existen algunas limitaciones definidas. La prueba solo se debe aplicar a especies microbianas que hayan sido cuidadosamente evaluadas; iv) Prueba epsilométrica (ETEST®; Biomerieux): una prueba moderna, bastante útil en el laboratorio, cuya ventaja radica en que es un método de difusión que da la concentración inhibitoria mínima del hongo para determinado antifúngico [31].

Técnicas para determinar actividad antifúngica

La expansión de compuestos antimicóticos fue un factor decisivo que hizo necesario desarrollar pruebas de susceptibilidad *in vitro*, estandarizadas y clínicamente relevantes, a fin de utilizarlas como guía en las decisiones terapéuticas, así como para evaluar la actividad antifúngica en las diferentes fases del desarrollo de nuevas drogas por parte de las compañías farmacéuticas. En el caso de los hongos filamentosos el método de elección es el de microdilución en caldo [24].

Técnica de dilución en caldo para hongos filamentosos

Muchos de los parámetros empleados en el desarrollo de pruebas de susceptibilidad para levaduras, fueron empleados en los procedimientos *in vitro* para hongos filamentosos. Para 1998 el CLSI publicó el manual M38-P, el cual fue aprobado en el año 2002 (M38-A) [24]. El procedimiento detalla la metodología de macrodilución y microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad en los hongos filamentosos más comunes que causan micosis invasivas como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenckii*. [24]. Para el año 2008 el CLSI publicó la segunda revisión del documento designándolo M38-A2, el cual contiene material adicional concerniente al control de calidad de las pruebas; se dan las recomendaciones para evaluar susceptibilidad a equinocandinas y antifúngicos contra dermatofitos; se añaden las recomendaciones sobre la preparación de inóculos en dermatofitos; se introduce el concepto de CME (Concentración Mínima Efectiva) y su comparación con el concepto tradicional de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) [24, 32]. También se encuentra disponible el manual del Comité Europeo para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana EUCAST, de sus siglas en inglés, el cual presenta la metodología para realizar pruebas de susceptibilidad en hongos filamentosos, pero no aporta ninguna especificación para los dermatofitos [33].

En vista de la necesidad de realizar estudios en pro del avance en cuanto a evaluación de actividad antifúngica del aceite de girasol ozonizado se plantean los objetivos, general y específicos, como se muestra a continuación.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite de girasol ozonizado en aislados fúngicos de micosis superficiales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la actividad del compuesto a diferentes tiempos de ozonización.
2. Establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) del Aceite de Girasol Ozonizado (AGO) con el tiempo óptimo de acción, por el método de microdilución en caldo, frente a diferentes agentes fúngicos productores de micosis superficiales.
3. Comparar la CIM y CFM del aceite de girasol ozonizado respecto a la de aceite de girasol sin ozonizar.

METODOLOGÍA

Tipo de investigación. Es un estudio pre-clínico, con un diseño experimental, analítico y transversal para determinar la actividad antifúngica de Aceite de Girasol Ozonizado (AGO) frente a diferentes hongos.

Microorganismos. Se utilizaron 40 aislamientos fúngicos a partir de casos clínicos de micosis superficiales, obtenidos en los laboratorios de Micología del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR), Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” y Laboratorio de Micología de la Clínica Santa Sofía. Cabe mencionar que la selección de la muestra es de tipo no probabilística e intencional. En la tabla 1 se muestran los aislados clínicos y cepas de referencia con sus respectivas procedencias.

Este estudio cumple con las normas establecidas por el Comité de Bioética y en acuerdo con los requisitos, establecidos en las normas de Bioética, cuya carta de compromiso de confidencialidad y de aprobación por el comité de bioética se encuentran en los anexos 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Microorganismos fúngicos utilizados para ensayos de actividad antifúngica frente a compuestos ozonizados

Microorganismos	INHRR	SAIBDJC	CSS	Total
Aislados clínicos				
<i>Candida albicans</i>	10			10
<i>Fusarium spp.</i>				10
Complejo <i>F. oxysporum</i>	6			
Complejo <i>F. solani</i>	2			
<i>F. chlamydosporum</i>	1			
<i>Fusarium incarnatum</i>	1			
Dermatofitos				20
<i>Microsporum canis</i>	4	7		
Complejo <i>T. rubum</i>	5	2	2	
Cepas de referencia				3
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1			
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1			
<i>C. albicans</i> ATCC 90028		1		

INHRR: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel; SAIBDJC: Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit; CSS: Clínica Santa Sofía.

Fase 1: Preparación del Aceite de Girasol Ozonizado (AGO).

Esta fase del estudio fue realizada por la Corporación Canciani C.A., RIF J-40126775-0, ubicada en Caracas, Venezuela. Es una empresa dedicada al desarrollo de proyectos de ingeniería y comerciales. El presidente de la empresa facilitó las muestras de aceite de girasol ozonizado para realizar los ensayos correspondientes, cuyos resultados fueron analizados debidamente en el presente trabajo de investigación. En representación de dicha empresa, hemos contado con la presencia del Dr. Diodoro Iacocca y del presidente MSc. Marco Canciani de la Universidad Central de Venezuela y Universidad Simón Bolívar respectivamente.

Procedimiento:

Se emplea aceite de girasol comercial, de uso comestible.

Se usa un equipo denominado TA-600, fabricado por la empresa Phoenixozono ubicada en Maracay. La capacidad de generación de ozono es de 6 gr/hora.

El método de ozonización es de difusión por burbujeo y agitación. Se sumerge un difusor poroso en una mezcla agua-aceite y se agita mecánicamente de forma constante durante todo el tiempo de ozonización. Los poros del difusor son de tamaño controlado, a fin de proporcionar burbujas que puedan interaccionar, con cierta eficacia, con las gotas del aceite de girasol dispersas en la fase acuosa.

En la línea que sale del ozonizador y se conecta al difusor se incluye una trampa enfriada convenientemente, cuya finalidad es condensar las gotas de ácido nítrico, que se genera por la presencia del nitrógeno y de la humedad en el aire que alimenta el aparato.

Se coloca en recipiente adecuado el aceite de girasol y agua destilada en una proporción conveniente. Se ozoniza a diferentes tiempos: 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos y 180 minutos.

Para los fines del presente trabajo se empleó una mezcla en la proporción 1:1 para las muestras preparadas a diferentes tiempos de ozonización.

A cada muestra se le asignó una letra a conveniencia que va de la "A" hasta la "D", dependiendo del grado de ozonización, como se muestra en la tabla 2.

Para la evaluación de las muestras no se contó con la concentración exacta de los componentes con actividad antimicrobiana, por lo que se emplearon valores porcentuales (%), partiendo de una muestra madre al 100% concentrada y realizando diluciones hasta alcanzar los valores porcentuales requeridos.

Tabla 2. Muestras ozonizadas ensayadas

Muestras	Tiempo de ozonización del compuesto (minutos)	Proporción aceite/agua destilada	Concentración teórica de O ₃ (gramos/hora)
A	10	1:1	1
B	20	1:1	2
C	30	1:1	3
D	180	1:1	18

Cada compuesto (A, B, C, D) posee una porción oleosa, una acuosa y una mezcla oleosa-acuosa.

Fase 2. Determinación de actividad antifúngica según tiempo de ozonización

Ensayo de sensibilidad por el método de Unidades formadoras de Colonias (UFC)

Esta metodología se llevó a cabo para evaluar la actividad antifúngica del aceite de girasol ozonizado a diferentes tiempos, probando tanto la parte oleosa como acuosa del compuesto. En los compuestos A y B adicionalmente se evaluó la mezcla de ambas presentaciones.

Microorganismo:

Este ensayo se realizó con la cepa de referencia *Candida albicans* ATCC 90028.

Procedimiento:

Se colectan 20 µL de cada uno de las muestras ozonizadas A, B, C y D, en sus diversas presentaciones, en tubos Eppendorf de 1,5 ml.

Se prepara un inóculo en solución salina fisiológica estéril, al 0,5 en la escala de McFarland por comparación visual con el patrón, que es equivalente a una concentración de 10^5 UFC/mL, a partir de colonias de *Candida albicans* ATCC 90028 de 24 horas de crecimiento en agar Sabouraud y se sirven 10 µL en cada uno de los tubos con las partes ozonizadas, mezclando cuidadosamente. Se expuso el microorganismo durante diferentes tiempos (0,5; 1; 3; 5; 10; 15; 30 y 60 minutos), a las partes antes mencionados, a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente se extrajeron 5 μL , y se sembraron en medio de agar Müller Hinton glucosado al 2% contenido en placas de Petri de 60 mm. Las placas se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. Una vez que transcurre el tiempo de incubación se procede a realizar el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Se realizó un control de crecimiento del hongo, inóculo sin muestra, la cual fue sustituida por solución salina fisiológica estéril; así mismo se realizaron los respectivos controles de esterilidad de las muestras, medios de cultivo y soluciones empleadas.

Fase 3. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Aceite de Girasol Ozonizado (AGO) por el método de microdilución en caldo

Se siguió la metodología descrita por los documentos CLSI M38-A2 para hongos filamentosos y CLSI M27-A3 para levaduras con algunas modificaciones [32, 34, 35].

Microorganismos ensayados: se ensayaron 10 aislados de *Candida albicans*, 11 *Microsporum canis*, 9 del complejo *Trichophyton rubrum*, 6 del complejo *Fusarium oxysporum*, 2 complejo *F. solani*, 1 *F. chlamydosporum* y 1 *F. incarnatum*. También se evaluaron las cepas de referencia señaladas en la tabla 1.

Mantenimiento de los aislamientos: se realizaron repiques bimestrales y se mantuvieron a 28°C.

Preparación de los inóculos: los inóculos se realizaron con cultivos entre uno a cinco días de crecimiento de las cepas según las indicaciones de los manuales CLSI antes mencionados. Las especificaciones de cultivo de cada género fúngico a ensayar se muestran en la tabla 3. Los cultivos se hicieron por duplicado para todos los aislamientos, excepto para el complejo *Trichophyton rubrum* que se hicieron por triplicado.

Tabla 3. Condiciones de cultivo de las cepas y los aislados para los ensayos de sensibilización *in vitro*

Microorganismo	Medio para subcultivar	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
<i>C. albicans</i>	Agar Sabouraud dextrosa	35°C	24 horas
<i>T. rubrum</i>	Agar lactrimel	30°C	4 a 5 días
<i>M. canis</i>	Agar lactrimel	30°C	4 a 5 días
Complejo <i>F. solani</i> y <i>F. oxysporum</i> <i>F. chlamydosporum</i> <i>F. incarnatum</i>	Agar lactrimel	35°C	72 horas*

* Una vez transcurridas 72 horas los cultivos se colocaron a 30°C hasta los 7 días.

Preparación de los inóculos de acuerdo al microorganismo

***Candida albicans*:** el inóculo se preparó tomando 5 colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro de 24 horas de crecimiento y fueron suspendidas en 5 mL de solución salina fisiológica estéril. La suspensión resultante se mezcló en vortex por 15 segundos. Se ajustó el inóculo al patrón 0,5 McFarland.

***M. canis* y complejo *T. rubrum*:** se colocó 2 mL de solución salina fisiológica estéril al tubo conteniendo el crecimiento correspondiente de cada hongo, se removieron las conidias y micelio fúngico mezclando en vortex por 3 a 5 veces de forma pulsátil. Luego se toma la suspensión con una pipeta estéril y se transvasa a un tubo estéril. Se dejó sedimentar las partículas durante 5 a 10 minutos, se tomó la suspensión homogénea, se realizó el conteo de las conidias con un hemocitómetro, se ajustó el inóculo a 3×10^3 conidias/mL.

Complejos *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, *F. chlamydosporum* y *F. incarnatum*: se colocaron 2 mL de solución salina fisiológica estéril al tubo conteniendo el crecimiento correspondiente de cada hongo, se removieron las conidias y micelio fúngico mezclando en vortex por 3 a 5 veces de forma pulsátil. Luego se toma la suspensión con una pipeta estéril y se coloca en un tubo estéril. Se deja sedimentar las partículas durante 5 a 10 minutos, se toma la suspensión homogénea, se ajustó el inóculo a una turbidez de 1 en la escala de McFarland con un patrón visual. La presencia de hifas y conidias se verificó por observación microscópica, mediante un examen al fresco donde se pudo

visualizar que la cantidad de hifas no superó el 5%. Posteriormente se realizó una dilución 1:50 en caldo RPMI para obtener la cantidad de conidios/mL entre $0,4$ a 5×10^4 .

Viabilidad del inóculo: este procedimiento se realizó para verificar la viabilidad de las conidias de hongos para:

Complejos *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, *F. chlamydosporum* y *F. incarnatum*: se siembra en placas con agar Sabouraud dextrosa $0,01$ mL de una dilución 1:10 del inóculo ajustado para determinar el número de unidades formadoras de colonias por mL. Se incuban las placas entre 28° y 30°C . Se observaron diariamente y se realiza el conteo tan pronto como las colonias fueron visibles (72 horas aproximadamente).

***M. canis* y complejo *T. rubrum*:** se colocó $0,01$ mL del inóculo ajustado en placas con agar Sabouraud dextrosa para determinar el número de UFC/mL. Se incubaron a 30°C y se observaron diariamente hasta que se observó la presencia de colonias fúngicas para la lectura (4 días).

Prueba de sensibilidad por microdilución en caldo

Se empleó el medio sintético RPMI-1640, de sus siglas en inglés Roswell Park Memorial Institute de la marca *SIGMA-ALDRICH*, con glutamina y glucosa, sin bicarbonato, con rojo fenol como indicador de pH, el cual es adecuado tanto para el ensayo de hongos levaduriformes como filamentosos. Se añadió glucosa hasta alcanzar una concentración al 2%, se le agregó búfer MOPS (de

sus siglas en inglés que significan ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico) a una concentración de 0,165 M y se llevó a pH 7,06.

1) Preparación de las muestras ozonizadas. Para esta prueba se ensayó la muestra D, con 3 horas de ozonización en proporción aceite / agua 1:1. Se optó por esta muestra debido a que mostró una actividad antifúngica mejor que las otras muestras en los ensayos previos que se habían realizado.

Se evaluaron las fracciones oleosa y acuosa. Se empleó el aceite de girasol sin ozonizar como control. Seguidamente se realizó una dilución 1:2 con Dimetilsulfóxido (DMSO) para las muestras oleosas y con agua destilada estéril para la parte acuosa de la muestras ozonizada; luego se continuó haciendo diluciones seriadas en medio RPMI-1640 hasta completar el rango de concentraciones finales entre 12,5% y 0,05% para las partes oleosas y entre 12,5% y 0,025% para la fracción acuosa, como se muestra en la tabla 6. Para los antifúngicos comerciales empleados como control de calidad del método, se realizaron soluciones madre de voriconazol a una concentración de 1.600 µg/mL y de fluconazol a 1.280 µg/mL. El solvente usado con los antifúngicos fluconazol y voriconazol fue agua destilada estéril. Seguidamente se llevaron a cabo diluciones doble seriadas de los antifúngicos en tubos (rotulados del 1 al 10) y el contenido de estos tubos a su vez se diluyó 1:50 en medio RPMI-1640. Los rangos de concentraciones finales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones ensayadas de AGO y de los antifúngicos comerciales de acuerdo a los hongos evaluados

Microorganismo	Muestras y antifúngicos comerciales	Concentración	Unidad
<i>C. albicans</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>M. canis</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>chlamydosporum</i> ,	Porción oleosa y acuosa de AGO; aceite sin ozonizar	12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025*	%
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019**	Fluconazol	64,00; 32,00; 16; 8,00; 4,00; 2,00 y 1,00	µg/mL
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258**	Voriconazol	16,00; 8,00; 4,00; 2,00; 1,00; 0,50 y 0,25	

AGO: aceite de girasol ozonizado; *0,025 sólo para la fracción acuosa ozonizada. ** Las cepas de referencia también fueron ensayadas con los compuestos ozonizados y el aceite sin ozonizar en el rango de concentraciones indicadas para los otros microorganismos.

2) Preparación de las microplacas. Las diluciones seriadas de las fracciones ozonizadas y aceite de girasol sin ozonizar se dispensaron en placas de poliestireno de 96 pozos fondo U en orden creciente comenzando por la menor concentración en los pozos de la columna 9 (partes oleosas) o 10 (parte acuosa) hasta la mayor concentración en los pozos de la columna 1, a razón de 100 μ L por pozo.

3) Ensayos en placas de microtitulación. Una vez servidas las diluciones de los antifúngicos en las placas, se procedió a colocar en cada pozo 100 μ L del inóculo previamente preparado, empleando pipetas multicanal. Cada placa por microorganismo contiene adicionalmente un pozo control de crecimiento, el cual posee solo el inóculo más el medio de cultivo y en otro pozo el inóculo más el solvente (DMSO) en rango de concentración por pozo del 2% que se utilizó para preparar los antifúngicos; un control de esterilidad, que contiene solo medio de cultivo en la columna 12. De la misma manera se realizaron las pruebas con los antifúngicos control, empleando microorganismos de referencia recomendados por el CLSI que se han indicado en la tabla 1. Las placas se incuban a 35°C, excepto los dermatofitos que se incubaron a 30°C, por el tiempo requerido (ver tabla 5).

Tabla 5. Tiempo de incubación de las placas de microdilución en caldo

Microorganismo	Antifúngico	Tiempo de incubación (horas)
<i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, <i>C. krusei</i> ATCC 6258		24 – 48
<i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Microsporum canis</i>	Fracción oleosa y acuosa de AGO y aceite sin ozonizar	Después de 96 horas
<i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. chlamydosporum</i> y <i>F. incarnatum</i>		46- 50
AGO: aceite de girasol ozonizado		

4) Lectura de resultados. Posterior a la incubación y obtenido adecuado crecimiento del control, se procedió a realizar la lectura de las placas de forma visual para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Posteriormente se determinó la Concentración Fungicida Mínima (CFM).

Para determinar la CFM se procedió a sembrar 20 μ L de 2 a 4 de los pozos, de las concentraciones por encima de la CIM obtenida, donde no hubo crecimiento visible, en placas conteniendo medio de Sabouraud agar, se incubaron a temperatura ambiente por 3 a 5 días y se cuantificó las unidades formadoras de colonias.

5) Interpretación de resultados. La CIM para AGO, fracción acuosa ozonizada y aceite de girasol sin ozonizar se consideró como la mínima concentración capaz de provocar una reducción visible de la población fúngica, del 50% o más, respecto al control de crecimiento y CFM como la mínima concentración que inhibe el crecimiento del hongo al realizar repiques en agar Sabouraud a partir de los pozos donde haya inhibición del 100%.

6) Control de calidad. Se verificó la calidad del método empleando las cepas de referencia *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 y *C. krusei* ATCC® 6258, como se recomienda en los documentos CLSI M38-A2 y M27-A3.

Análisis de datos. En los datos obtenidos se realizó descripción estadística en base a valores numéricos y medidas de tendencia central. Se utilizó el programa office Excel para el análisis de los estadísticos descriptivos. Para la

estadística inferencial se empleó el paquete estadístico SPSS versión 23. Se evaluaron las variaciones entre las cinéticas de muerte de diferentes compuestos por análisis de Varianza ANOVA con el test de Diferencias Mínimas Significativas (DMS). La comparación entre las concentraciones mínimas inhibitorias de las porciones oleosa y acuosa del aceite de girasol ozonizado y el aceite de girasol sin ozonizar, fue analizada por la prueba estadística U de Mann-Whitney para análisis de variables no paramétricas de tipo independientes. Este estudio fue de una cola con un valor $Z \geq 1,64$.

RESULTADOS

Fue evaluada la actividad antifúngica *in vitro* de Aceite de Girasol Ozonizado (AGO) frente a 40 aislados fúngicos, obtenidos a partir de lesiones de micosis superficiales: 10 *Candida albicans* procedían de candidiasis oral, 11 *Fusarium* spp. (6 complejos *F. oxysporum* y 2 *F. solani*, 1 *F. chlamydosporum* y 1 *F. incarnatum*) de onicomycosis, 20 dermatofitos, 11 de los cuales se corresponde a *Microsporum canis*, como agente causal de *Tinea capitis* y 9 complejo *Trichophyton rubrum* como agente causal de *Tinea unguium*.

Por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) con *Candida albicans* ATCC 90028 se obtuvo lo siguiente:

1.- Muestra ozonizada D

Con las muestras ozonizadas A, B, C y D, que la muestra D (AGO con 3 horas de ozonización en proporción 1:1 aceite/agua) tanto la porción oleosa como acuosa, fue la más efectiva para inhibir el crecimiento del microorganismo en un lapso menor de tiempo (menor de 15 minutos), siendo la fracción acuosa la más eficaz (tablas 6 y 7).

2.- Muestra ozonizada A

La muestra A (AGO: 10 min de ozonización proporción 1:1 aceite/agua), en su fracción oleosa, a los 15 minutos presentó una reducción de la población fúngica mayor al 50%, con una inhibición total a los 60 minutos; mientras que, la fracción acuosa tuvo una reducción mayor al 50% a los 10 minutos y total a

los 30 minutos. Por su parte la mezcla de ambas fracciones del compuesto mostró mejores resultados, con reducción mayor al 90% a los 15 minutos y del 100% a los 30 minutos (tablas 6 y 7).

3.- Muestra ozonizada B

Para la muestra B (AGO: 20 minutos de ozonización proporción agua/aceite 1:1) en sus fracciones oleosa y acuosa, a los tres minutos de exposición hubo una reducción mayor al 50% e inhibición total a los 15 y 30 minutos; mientras que la mezcla de ambas fracciones del compuesto, mostró una inhibición alrededor del 50% a los 5 minutos e inhibición total a los 30 minutos (tablas 6 y 7).

4.- Muestra ozonizada C

La muestra C (AGO: 30 minutos de ozonización en proporción aceite agua 1:1) y el D (AGO: 180 minutos de ozonización en proporción aceite agua 1:1) tuvieron una reducción del 50% al minuto de exposición en sus porciones oleosa y acuosa. Para la fracción oleosa del compuesto C, la reducción mayor al 90% se alcanzó a los 30 minutos y del 100% a los 60 minutos; en cuanto que, la fracción acuosa alcanzó reducir el 90% de la población a los 15 minutos y el 100% a los 30 minutos. Por su parte, con la muestra D se obtuvo una reducción mayor al 90% a los 10 minutos y del 100% a los 15 minutos. Ver figura 2, tablas 6 y 7. El aceite de girasol sin ozonizar, ensayado como control, no inhibió el desarrollo fúngico en los tiempos evaluados.

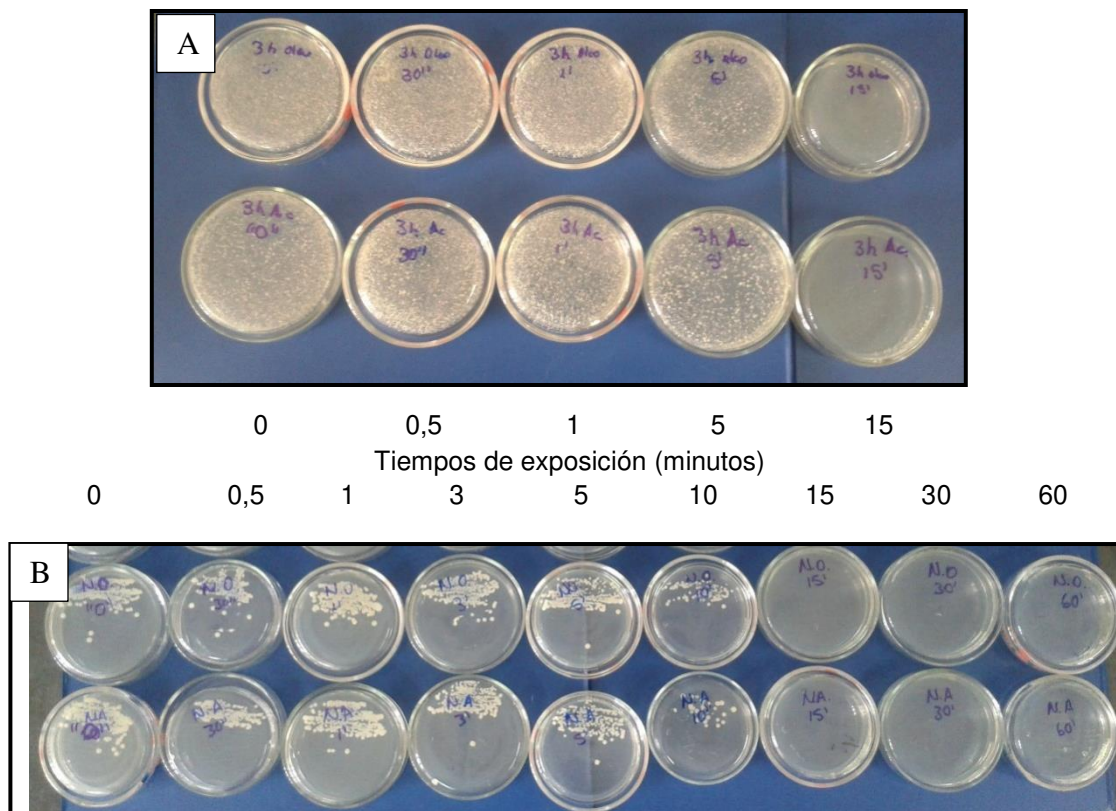


Figura 2. Actividad antifúngica de las fracciones acuosa y oleosa de la muestra D (aceite de girasol ozonizado por tres horas en proporción 1:1 aceite/agua) con la cepa ATCC 290028 *C. albicans*. A) Muestra en la fila superior la fracción oleosa y en la inferior la fracción acuosa, durante los tiempos de exposición 0; 0,5; 1; 5 y 15 minutos. B) Muestra la misma disposición de las fracciones ozonizadas, con los diferentes tiempos de exposición.

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad obtenidos con la cepa ATCC 90028 *Candida albicans* frente a las muestras ozonizadas a diferentes tiempos de exposición

		Porcentaje de viabilidad								
Muestras	Porción	Tiempo de exposición en minutos								
		0	0,5	1	3	5	10	15	30	60
A	Oleosa	100	98	75	75	75	68	42	23	0
	Acuosa	100	99	64	64	63	42	8,4	0	0
	Mezcla	100	93	90,3	85	64,5	18,3	2,1	0	0
B	Oleosa	100	92	55	47	47	47	15	0	0
	Acuosa	100	100	66	48	43,6	12,8	0	0	0
	Mezcla	100	88	80,4	72,8	52,2	13	1	0	0
C	Oleosa	100	60	50	45	35	30	20	1	0
	Acuosa	100	60	50	45	40	10	7	0	0
D	Oleosa	100	60	50	45	40	7	0	0	0
	Acuosa	100	60	50	45	40	1,6	0	0	0
Aceite sin ozonizar	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A: aceite de girasol ozonizado por 10 minutos con agua en proporción 1:1;

B: aceite de girasol ozonizado por 20 minutos con agua en proporción 1:1;

C: aceite de girasol ozonizado por 30 minutos con agua en proporción 1:1;

D: aceite de girasol ozonizado por 180 minutos con agua en proporción 1:1.

Tabla 7. Tiempos de letalidad obtenidos con la cepa ATCC 90028 *Candida albicans* frente a las muestras ozonizadas

Muestras	Porción	Tiempos de letalidad en minutos		
		TE ₅₀	TE ₉₀	TE ₁₀₀
A	Oleosa	15	>30	60
	Acuosa	10	15	30
	Mezcla	10	15	30
B	Oleosa	3	>15	30
	Acuosa	3	>10	15
	Mezcla	10	>10	30
C	Oleosa	1	30	60
	Acuosa	1	15	30
D	Oleosa	1	10	15
	Acuosa	1	10	15

A: aceite de girasol ozonizado por 10 minutos con agua en proporción 1:1;
 B: aceite de girasol ozonizado por 20 minutos con agua en proporción 1:1;
 C: aceite de girasol ozonizado por 30 minutos con agua en proporción 1:1;
 D: aceite de girasol ozonizado por 180 minutos con agua en proporción 1:1;
 TE₅₀: tiempo en que el compuesto elimina al 50% de la población fúngica;
 TE₉₀: tiempo en que el compuesto inhibe al 90% de la población fúngica;
 TE₁₀₀: tiempo en que el compuesto elimina al 100% de la población fúngica.

De acuerdo a los cálculos de curvas de letalidad [36] se obtuvo que con todos los compuestos entre los 15 y 60 min de exposición con el microorganismo, la actividad fue fungicida a las concentraciones ensayadas, obteniéndose el 100% de inhibición del crecimiento. Para el compuesto A, en sus 3 fracciones, la actividad antifúngica inicia a partir del minuto 5, mientras que para el resto de los compuestos inicia casi de inmediato (ver figura 3). El tiempo en que se observa actividad fungicida del compuesto, momento en el cual la población fúngica descendió por debajo de 3 log con respecto al tiempo inicial, presentó un mínimo de 7,5 minutos para la fracción acuosa del compuesto D y un máximo de 49 minutos para la fracción oleosa del compuesto A (ver tabla 8).

De las gráficas de la figura 3 se desprende que para todas las muestras se puede definir un tiempo de inducción de actividad antifúngica de 5 minutos aproximadamente y luego cada una de ellas presenta una actividad antifúngica específica en función del tiempo.

Analizando las pendientes de las diferentes muestras ozonizadas, por análisis de varianza ANOVA, aplicando el test de la Diferencia mínima Significativa (DMS), se encontró que la muestra D (180 minutos de ozonización) fue más eficaz que el resto de las muestras, con una significancia menor a 0,05 y un intervalo de confianza del 95%. Esto demuestra que el tiempo de ozonización de las muestras es un parámetro importante que influye sobre la actividad fungicida del mismo.

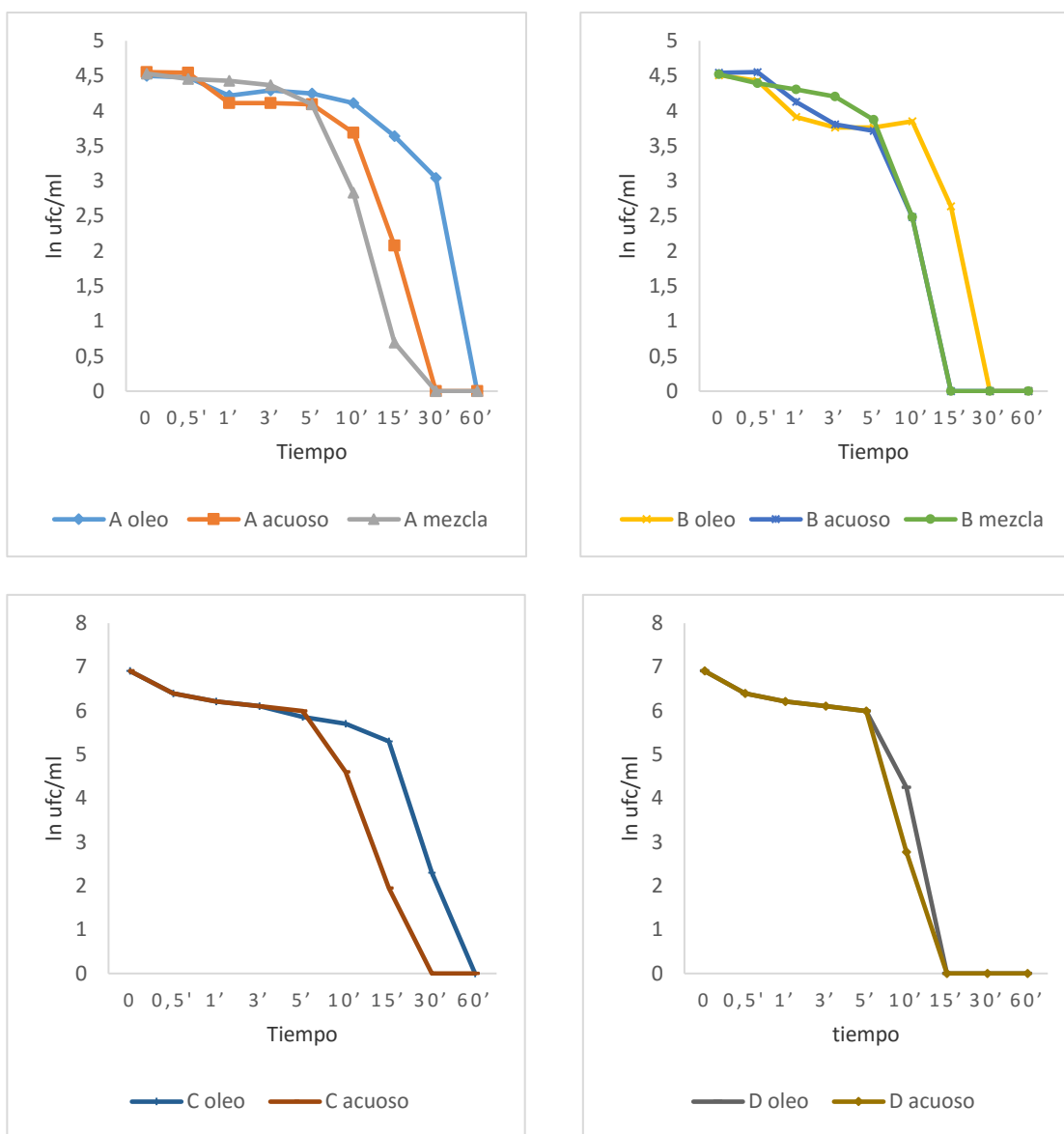


Figura 3. Curvas de letalidad de diferentes compuestos ozonizados frente a la cepa ATCC 90028 *Candida albicans*

Tabla 8. Tiempo fungicida y tasa de letalidad de las muestras ozonizadas frente a la cepa ATCC 90028 *C. albicans*.

Muestras	Porción	Tiempo fungicida	
		(minutos)	Tasa de letalidad
A	Oleoso	49	-0,061
	Acuoso	15	-0,201
	Mezcla	13	-0,252
B	Oleoso	27,3	-0,112
	Acuoso	12,2	-0,245
	Mezcla	10,8	-0,277
C	Oleoso	17,6	-0,170
	Acuoso	12,5	-0,239
D	Oleoso	8,6	-0,348*
	Acuoso	7,5	-0,643*

A: aceite de girasol ozonizado por 10 minutos con agua en proporción 1:1;

B: aceite de girasol ozonizado por 20 minutos con agua en proporción 1:1;

C: aceite de girasol ozonizado por 30 minutos con agua en proporción 1:1;

D: aceite de girasol ozonizado por 180 minutos con agua en proporción 1:1.

* Significancia respecto a los otros compuestos ($p \leq 0,05$).

Se determinaron las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) y las Concentraciones Fungicidas Mínimas (CFM) por el método de microdilución en caldo, con la muestra D (aceite de girasol con 3 horas de ozonización en proporción aceite/agua 1:1, el cual presentó mejor actividad antifúngica en ensayos previos), frente a los diferentes aislados de *Candida albicans*, *Fusarium* spp., *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y las cepas de referencia *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Se obtuvieron las CIM para las levaduras del género *Candida* (ver tabla 9), con valores comprendidos entre 0,75% y 0,4% para la porción oleosa de la muestra ozonizada; entre 6,25% y 1,5% para la porción acuosa de la muestra ozonizada; y de 3,125% hasta >12,5% para el Aceite de Girasol Sin Ozonizar (AGSO) empleado como control. Mientras que, las CFM oscilaron entre 0,75% y 6,25% para la fracción oleosa de la muestra; entre 3,125% y 12,5% para la fracción acuosa ozonizada; y entre 6,25 y > 12,5% para el AGSO. Se encontraron diferencias significativas entre las CIM y CFM de la porción oleosa de las muestras ozonizadas, siendo estas más efectivas, en comparación a las CIM y la CFM del aceite sin ozonizar; mientras que para la porción acusa no se encontró buena actividad respecto al control o no hubo prácticamente diferencia.

Tabla 9. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M27-A3 del CLSI para los aislados de *Candida albicans* y cepas control frente a las muestras ozonizadas y el aceite sin ozonizar

	Muestras					
	AGSO		AGO		Ac	
	CIM	CFM	CIM*	CFM*	CIM	CFM
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Candida albicans</i>						
L-412000-97	3,125	12,5	0,75	3,125	6,25	12,5
L-412000-98	3,125	12,5	0,75	6,25	6,25	12,5
L-412000-99	3,125	12,5	0,75	3,125	6,25	12,5
L-412000-243	3,125	6,25	0,4	0,75	1,5	3,125
L-412000-244	3,125	6,25	0,75	3,125	6,25	12,5
L-412000-245	3,125	12,5	0,4	3,125	6,25	12,5
L-412000-254	3,125	12,5	0,75	3,125	6,25	12,5
L-412000-283	3,125	12,5	0,75	3,125	6,25	12,5
L-412000-285	3,125	6,25	0,4	0,75	0,75	6,25
L-412000-305	3,125	12,5	0,75	3,125	6,25	12,5
ATCC90028	>12,5	-	0,4	6,25	6,25	12,5
<i>C. krusei</i>	3,125	> 12,5	0,75	6,25	1,5	3,125
ATCC6258						
<i>C. parapsilosis</i>	3,125	12,5	0,75	3,125	3,125	12,5
ATCC22019						

AGO: Aceite de Girasol Ozonizado; Ac: fracción acuosa ozonizada;
 AGSO: Aceite de Girasol Sin Ozonizar; CIM: Concentración Inhibitoria Mínima;
 CFM: Concentración Fungicida Mínima.

* Significancia respecto al aceite sin ozonizar ($p \leq 0,05$), con un valor de $Z \geq 1,64$.

Para los aislados de *Fusarium* spp se hallaron CIM en el rango de 0,75% - 1,5% para la fracción oleosa ozonizada; de 0,4% - 1,5% para la porción acuosa, con diferencias significativas entre las CIM respectivas, siendo estas de 3 a 4 veces más eficaces respecto a la CIM del AGSO. De las CFM, con la parte oleosa ozonizada se obtuvo un rango de concentraciones entre 3,125% - 12,5% y de 1,5% – 6,25% con la porción acuosa del mismo. Para el aceite sin ozonizar, la CIM fue de 3,125% en todos los aislados; mientras que, las CFM estuvieron en un rango de 6,25%- > 12,5% (ver tabla 10).

Las CIM y CFM obtenidas para *Microsporum canis* y complejo *T. rubrum* frente a las muestras ozonizadas y el control se muestran en las tablas 11 y 12 respectivamente. Para la porción acuosa ozonizada, las CIM y CFM en *T. rubrum* y *M. canis* fueron de 0,1% – 0,2% y 0,1% - 0,75% respectivamente; mientras que para las CIM de AGSO se obtuvieron rangos entre 0,05% - 0,4% frente a *M. canis* y de 0,4% - 0,75% para *T. rubrum*. Las CFM de AGSO se encontraron en un rango de 0,1% - 3,125% para *M. canis* y de 1,5% a 6,125% para *T. rubrum*. Hubo diferencias significativas entre el promedio de CIM y CFM, de la porción acuosa, frente a los aislados de *T. rubrum*, respecto al control, con un valor $p \leq 0,05$, siendo más efectiva la fracción acuosa. En las placas de microdilución, preparadas con la parte oleosa del compuesto para evaluar actividad contra dermatofitos, no hubo desarrollo fúngico, lo que impidió realizar las lecturas correspondientes.

Tabla 10. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los aislados clínicos de diferentes especies de *Fusarium* frente a las muestras ozonizadas.

Microorganismo	Muestras					
	AGSO		AGO		Ac	
	CIM (%)	CFM (%)	CIM* (%)	CFM* (%)	CIM* (%)	CFM* (%)
<i>Fusarium oxysporum</i>						
78160	3,125	6,25	1,5	6,25	0,75	3,125
104493	3,125	6,25	0,75	6,25	0,4	3,125
99466	3,125	6,25	0,75	6,25	0,4	3,125
101861	3,125	> 12,5	0,75	12,5	0,4	1,5
IBM-247-12	3,125	12,5	1,5	6,25	1,5	3,125
IBM-330-12	3,125	12,5	0,75	3,125	0,75	3,125
<i>F. solani</i>						
F-412000-91	3,125	6,25	1,5	3,125	0,4	3,125
IBM-308-12	3,125	12,5	0,75	3,125	0,75	3,125
<i>F. chlamydosporum</i>	3,125	12,5	1,5	3,125	1,5	6,25
<i>F. incarnatum</i>	3,125	12,5	1,5	3,125	1,5	3,125

AGO: Aceite de Girasol Ozonizado; Ac: fracción acuosa ozonizada;
 AGSO: Aceite de Girasol Sin Ozonizar; CIM: Concentración Inhibitoria Mínima;
 CFM: Concentración Fungicida Mínima.

* Significancia respecto al AGSO ($p \leq 0,05$), del promedio de los valores obtenidos.

Tabla 11. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los aislados de *Microsporium canis* frente a la muestra D ozonizada y aceite de girasol sin ozonizar.

Microorganismo	Muestras					
	AGSO		AGO		Ac	
	CIM (%)	CFM (%)	CIM (%)	CFM (%)	CIM (%)	CFM (%)
<i>Microsporium canis</i>						
37-312	-**	-	-	-	-	-
IBM-236-16	0,2	1,5	-	-	0,1	0,2
IBM-284-16	0,2	1,5	-	-	0,2	0,4
IBM-287-16	0,05	0,1	-	-	0,1	0,2
37-245	0,2	0,4	-	-	0,1	0,2
IBM-212-16	0,1	0,2	-	-	0,1	0,2
608-299	0,1	0,2	-	-	0,1	0,2
IBM-335-16	0,2	0,4	-	-	0,1	0,2
106837	0,4	0,75	-	-	0,1	0,4
IBM-402-16	0,4	3,125	-	-	0,1	0,2
IBM-401-16	0,2	0,4	-	-	0,1	0,2

AGO: Aceite de Girasol Ozonizado; Ac: fracción acuosa ozonizada;
 AGSO: Aceite de Girasol Sin Ozonizar; CIM: Concentración Inhibitoria Mínima;
 CFM: Concentración Fungicida Mínima.

** - No hubo desarrollo fúngico.

Tabla 12. Valores de CIM y CFM obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los aislados de *Trichophyton rubrum* frente a la muestra D ozonizada y aceite de girasol sin ozonizar.

Microorganismo	Muestras					
	AGSO		AGO		Ac	
	CIM (%)	CFM (%)	CIM (%)	CFM (%)	CIM* (%)	CFM* (%)
<i>Trichophyton rubrum</i>						
32-269	0,4	3,125	-**	-	0,2	0,4
CSS-16715	0,4	3,125	-	-	0,2	0,4
33-688	0,75	6,125	-	-	0,2	0,75
32-363	0,75	1,5	-	-	0,1	0,4
32-211	-	-	-	-	-	-
CSS-16666	0,4	1,5	-	-	0,2	0,4
23-16	0,4	3,125	-	-	0,2	0,2
IBM-310-16	0,4	3,125	-	-	0,2	0,4
IBM-848-15	0,75	3,125	-	-	0,2	0,4

AGO: Aceite de Girasol Ozonizado; Ac: fracción acuosa ozonizada;
 AGSO: Aceite de Girasol Sin Ozonizar; CIM: Concentración Inhibitoria Mínima;
 CFM: Concentración Fungicida Mínima.

* Significancia respecto al AGSO ($p \leq 0,05$) del promedio de los valores obtenidos.

** - No hubo desarrollo fúngico.

En la tabla 13 se muestra los rangos de CIM y CFM de los hongos evaluados.

En la figura 4 y 5 los valores máximos de CIM y CFM obtenidos.

Tabla 13. Rango de las CIM y CFM del aceite de girasol ozonizado y sin ozonizar frente a los microorganismos ensayados.

Rango de CIM y CFM (%)							
	n	AGSO		AGO		Ac	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> ATCC90028	1	>12,5	-	0,4	6,25	6,25	12,25
<i>C. krusei</i> ATCC6258	1	3,125	> 12,5	0,75	6,25	1,5	3,125
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	1	3,125	12,5	0,75	3,125	3,125	12,5
<i>Candida albicans</i>	10	3,125	6,25 - > 12,5	0,4 - 0,75*	0,75 - 6,25*	1,5 - 6,25	3,125 - 12,5
<i>Fusarium spp.</i>	11	3,125	6,25 - >12,5	0,75 - 1,5*	3,125 - 6,25*	0,4 - 1,5*	1,25 - 6,25*
<i>Microsporum canis</i>	10	0,05 - 0,4	0,1 - 3,125	-**	-	0,1 - 0,2	0,2 - 0,4
<i>Trichophyton rubrum</i>	8	0,4 - 0,75	1,5 - 6,25	-	-	0,1 - 0,2*	0,2 - 0,75*

AGO: Aceite de Girasol Ozonizado; Ac: fracción acuosa ozonizada;
AGSO: Aceite de Girasol Sin Ozonizar; CIM: Concentración Inhibitoria Mínima;
CFM: Concentración Fungicida Mínima.

* Significancia respecto al AGSO ($p \leq 0,05$) del promedio de los valores obtenidos.

** - No hubo desarrollo fúngico.

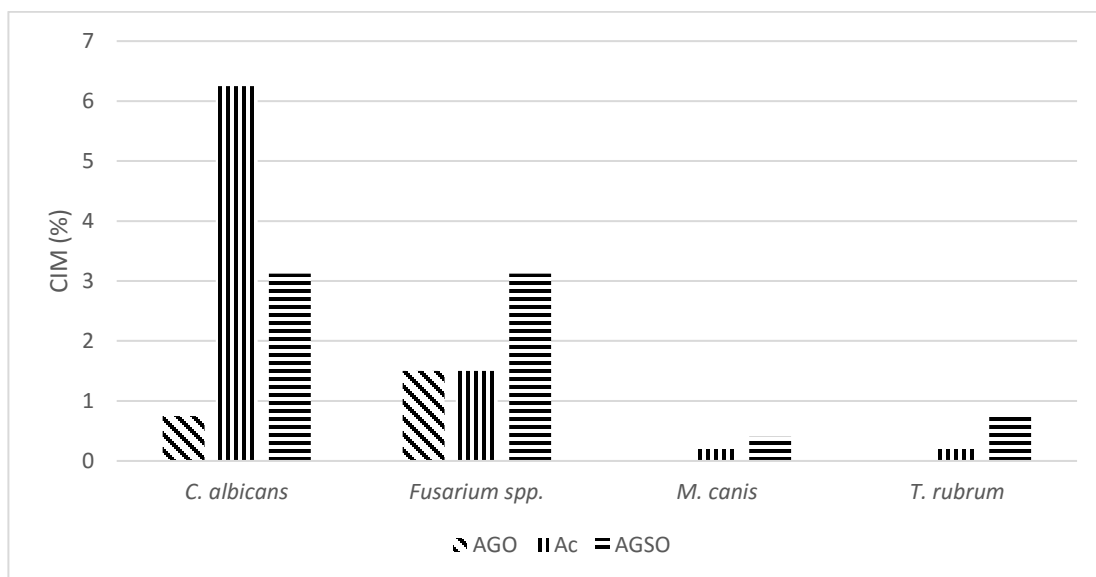


Figura 4. Valores máximos de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) obtenidos por el método M38-A2 y M27-A3 del CLSI de los microorganismos ensayados frente a la porción oleosa y acuosa ozonizada de la muestra D y el control. AGO: aceite de girasol ozonizado; Ac fracción acuosa ozonizada; AGSO: aceite de girasol sin ozonizar.

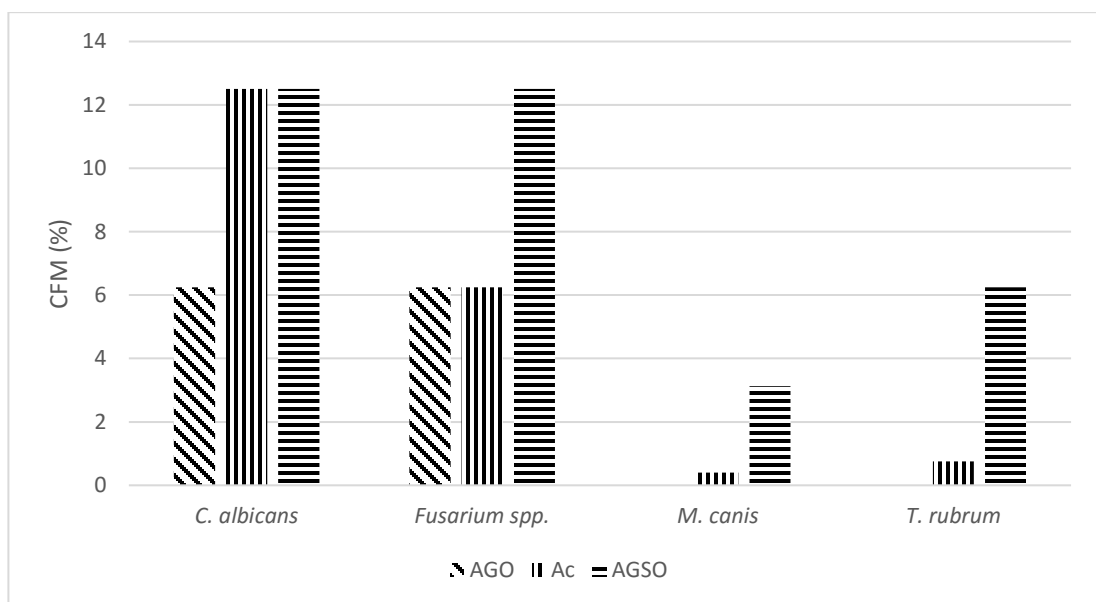


Figura 5. Valores máximos de concentraciones fungicidas mínimas (CFM) obtenidos por el método M38-A2 y M27-A3 del CLSI de los microorganismos ensayados frente a la porción oleosa y acuosa ozonizada de la muestra D y el control. AGO: aceite de girasol ozonizado; Ac fracción acuosa ozonizada; AGSO: aceite de girasol sin ozonizar.

En las figuras 6, 7, 8 y 9 se muestran ejemplos de los resultados obtenidos por el método de microdilución en caldo para los diferentes aislados fúngicos evaluados frente a la muestra D, con 180 minutos de ozonización.



Figura 6. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción oleosa de la muestra D (3 horas de ozonización) frente a dos aislados de *Candida albicans* por duplicado, a las 48 horas de incubación. CC: control de crecimiento; CC + DMSO: control de crecimiento con DMSO al 2%; CE: control de esterilidad.

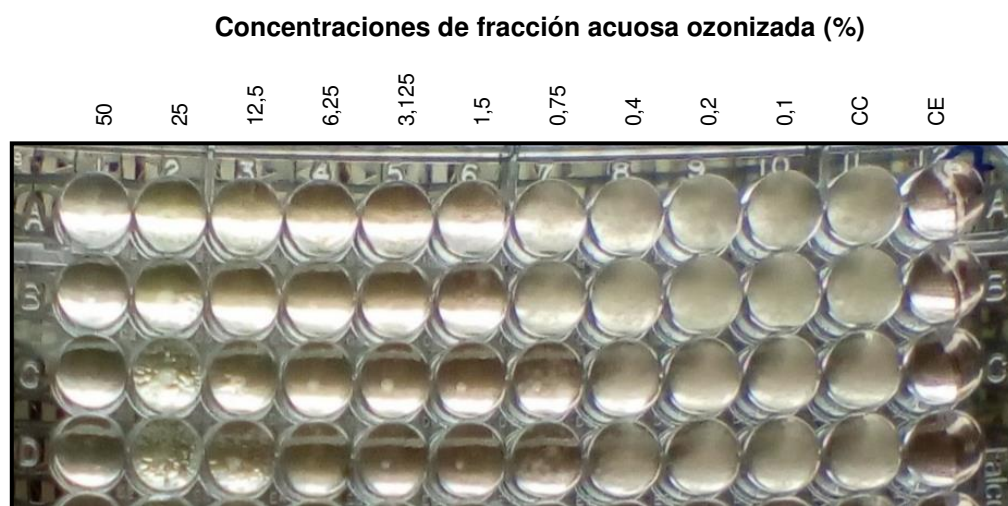


Figura 7. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción oleosa de la muestra D (3 horas de ozonización) frente a dos aislados del Complejo *Fusarium oxysporum* por duplicado, a las 48 horas de incubación. CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad.

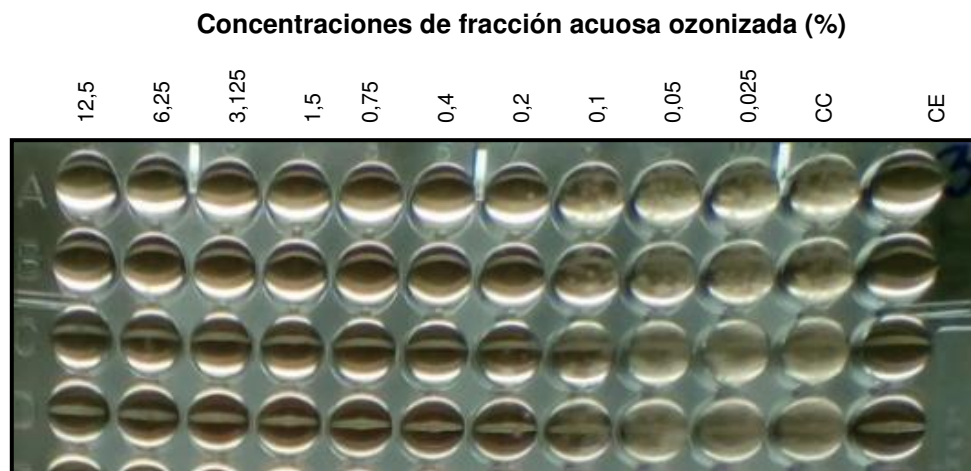


Figura 8. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción acuosa de la muestra D (3 horas de ozonización) frente a dos aislados de *Microsporium canis* por duplicado, a las 96 horas de incubación. CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad.

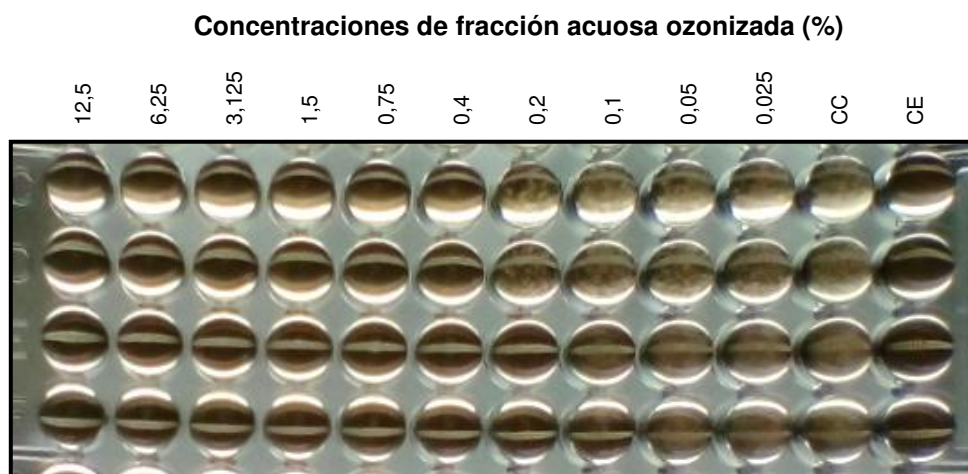


Figura 9. Placa de microdilución en caldo de ensayo con la fracción acuosa de la muestra D (3 horas de ozonización) frente a dos aislados del Complejo *Trichophyton rubrum* por duplicado, a las 96 horas de incubación. CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad.

Los fármacos comerciales voriconazol y fluconazol, ensayados con las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258, como control del método, se encontraron dentro de los valores esperados, obteniendo las siguientes lecturas de concentraciones inhibitorias mínimas a las 48 horas de incubación:

- *Candida krusei* Fluconazol 16 µg/mL y Voriconazol 0,25 µg/mL.
- *Candida parapsilosis* Fluconazol 1 µg/mL y Voriconazol 0,03 µg/mL.

DISCUSIÓN

Las infecciones fúngicas a nivel tópico tiene una importante prevalencia en todo el mundo, como son las causadas por dermatofitos, que afectan principalmente la parte estética del individuo; en cambio las onicomicosis causadas por hongos no dermatofitos como *Fusarium* spp., representa una posible puerta de entrada para infección sistémica en pacientes inmunosuprimidos; en las úlceras varicosas, úlceras de pie diabético y las heridas en piel, pueden estar involucrados agentes fúngicos como levaduras del género *Candida* y hongos filamentosos como *Fusarium* spp. [1, 3, 5, 37]. El creciente aumento de resistencia antifúngica en diferentes hongos de interés clínico versus la toxicidad que tienen algunos antifúngicos de administración oral, más los elevados costos que estos presentan, hacen necesario investigar y desarrollar compuestos alternativos [2, 4, 6, 7]. En la naturaleza existen numerosos compuestos con gran potencial antimicrobiano para el hombre y que deben explotarse para generar beneficios en pro de la salud de la población. Dentro de los compuestos que se han estudiado para determinar actividad antifúngica tenemos, el bulbo de ajo (*Allium sativum*) cuyo principio activo es el ajoene [14-16], Eucalipto (*Eucalyptus terreticornis*, *Myrtaceae*), cascara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) [9], aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) [12], extracto de semillas de pimienta (*Piper regnellii*) [13, 38], albahaca morada (*Ocimum sanctum*) [39], granado (*Punica granatum*) [10], *Polyscias fulva* [40], entre otros, así como el aceite de girasol

ozonizado [18, 19, 21, 28]. Sin embargo, se requiere de estudios para la evaluación y optimización de estos productos naturales, con el fin de determinar el grado de actividad antimicrobiana, sus efectos adversos, estabilidad, modo de empleo o aplicación, entre otros; pudiendo emplearse solos o combinados con compuestos disponibles en el mercado para el uso en pacientes [41, 42].

En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* del aceite de girasol ozonizado por el método de unidades formadoras de colonias (UFC) y por el método de microdilución en caldo frente a diferentes aislados fúngicos, procedentes de micosis superficiales. Los resultados obtenidos apuntan a que la ozonización de aceite de girasol en combinación con agua, optimiza de manera significativa la actividad antimicrobiana [30]. En nuestros ensayos, además de probar la porción oleosa del compuesto, se probó la parte acuosa también. Los estudios publicados hasta el presente, se refieren únicamente a estudios de actividad antifúngica de la fase oleosa ozonizada; hasta donde se tiene conocimiento este viene a ser el primer trabajo *in vitro* donde se estudia la actividad antifúngica de la fracción acuosa de la muestra ozonizada. Los resultados obtenidos, con bajas CIM y CFM en *Fusarium* spp., muestran que, en este caso, son por lo menos comparables y hasta mejores de los que se logran con la porción oleosa. En el caso específico de *Trichophyton rubrum* el efecto inhibitorio y fungicida fue altamente eficaz. Esto amplía el rango de usos del compuesto, el cual ya no sería solo en presentación oleosa, sino que la

fracción acuosa sería una alternativa que permitiría el desarrollo de presentaciones de uso clínico por separado o de mezclas, que faciliten su penetración en los tejidos [41]. Esta es una ventaja apreciable frente a los resultados reportados por otros investigadores, los cuales con el objeto de disminuir la viscosidad del aceite de girasol ozonizado, han realizado un tratamiento previo a la ozonización, con alcoholes de bajo peso molecular. Los resultados obtenidos por esta vía de actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* (en modelos murinos) frente a diferentes especies de dermatofitos, son comparables con los que se obtienen con la fracción acuosa de la muestra ozonizada [8]. Existe en el mercado otro producto de aceite girasol ozonizado, denominado OLEOZON®, el cual es el resultado de la ozonización del aceite de girasol solo [43]. Este producto comercial ha sido ensayado frente a distintas bacterias como, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y diferentes especies de micobacterias, mostrando actividad antimicrobiana contra todas las bacterias, con rangos de concentración entre 1,8 mg/mL y 9,5 mg/mL. [29]. También se ha evaluado en pacientes con *Tinea pedis* y en onicomicosis con resultados de cura clínica del 92% y 90% respectivamente, con escasos efectos adversos [18, 28].

La actividad antifúngica del AGO por el método de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) frente a la cepa ATCC 90028 *Candida albicans*, muestra actividad fungicida en todos los compuestos evaluados a la concentración

ensayada, encontrando diferencias significativas en la cinética de letalidad para la muestra D, con 180 minutos de ozonización, respecto a las muestras A (10 minutos de ozonización), B (20 minutos) y C (30 minutos de ozonización). Todas estas muestras tenían una proporción de aceite/agua 1:1. Esto demuestra que el tiempo de ozonización del aceite influye en la actividad antifúngica del mismo. Se abre de esta manera una vía interesante de investigación para obtener datos relativos a los tiempos de ozonización y a las preparaciones de las muestras de AGO en distintas proporciones, con solventes diferentes al agua destilada. Moreau y col. (2015) [30] realizaron un estudio donde determinaron cómo influyen las condiciones experimentales en la composición y la actividad antibacteriana del aceite de girasol ozonizado. Encontraron que cuando se adiciona agua en el proceso de ozonización la concentración de peróxido, que es el principal componente de acción antimicrobiana, aumenta de manera proporcional en función del tiempo de ozonización, con diferencias bastante marcadas respecto a cuándo no se adiciona agua. Estos investigadores solo evaluaron la porción oleosa ozonizada; en cambio, en este ensayo se prueba la parte acuosa, demostrando que, dicha fracción tiene una importante actividad antifúngica. Por otro lado, en el presente trabajo, los tiempos en que la viabilidad de la cepa de *C. albicans* se hizo cero, fueron entre 15 hasta 60 minutos para todas las muestras; en contraste Zanardi y colaboradores en el año 2013 [44] publicaron un estudio donde determinaron porcentajes de viabilidad de diferentes géneros bacterianos y de *C. albicans* ATCC 90028 frente al aceite de sésamo

ozonizado, obteniendo inhibición total de la cepa de *C. albicans* ATCC 90028 a las 6 horas de exposición, eliminando al microorganismos en tiempos mayores a los obtenidos con aceite de girasol ozonizado. Cabe mencionar que los investigadores no emplearon ninguna mezcla en el proceso de ozonización.

En esta investigación se demostró que tanto la fracción oleosa como acuosa del aceite de girasol ozonizado tienen actividad antifúngica.

Empleando el método de microdilución en caldo según las recomendaciones del CLSI para evaluar CIM y CFM del compuesto D por presentar mejor actividad en ensayos previos, se obtuvo que para los aislados clínicos de *Candida albicans* y las cepas de referencia, la fracción oleosa del compuesto inhibió de forma efectiva el desarrollo fúngico con CIM entre 0,4% y 0,75%; por el contrario la porción acuosa del compuesto, en este caso no tuvo buena actividad contra estos microorganismos. Por su parte, los aislados de *Fusarium* spp exhibieron actividad inhibitoria tanto para la fracción oleosa como acuosa del compuesto, con CIM en los rangos de 0,75% - 1,5% y de 0,4% - 1,5% respectivamente; mientras que, los valores de CFM para la porción acuosa casi todos los aislados estuvieron en 3,125%, excepto un aislado de Complejo *F. oxysporum* que tuvo un valor de CFM de 1,5% y *F. chlamydosporum* con 6,25%, siendo esta ultima la CFM más elevada del grupo. Para los aislados de *Microsporum canis* no se apreció mayor diferencia entre las CIM y CFM de la porción acuosa ozonizada y el control (AGSO). Mientras

que, Complejo *Trichophyton rubrum* tuvo diferencias significativas en las CIM y CFM frente a la porción acuosa ozonizada respecto al control, siendo la muestra ozonizada más efectiva tanto para inhibir como para matar al hongo. En el año 2011, Thomson y colaboradores [8] realizaron un trabajo en el cual determinaron actividad antifúngica del aceite de girasol ozonizado frente a diferentes especies de dermatofitos, obteniendo CIM y CFM $\leq 1\%$ y $\leq 2\%$ respectivamente. En el presente trabajo no se obtuvo resultados de la fracción oleosa ozonizada, más si, de la fracción acuosa, donde se presentaron valores de CIM y CFM $\leq 0,2\%$ y $\leq 0,75\%$, siendo estos relativamente mejores que los obtenidos por los investigadores mencionados, quienes también evaluaron actividad en las cepas de *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258, obteniendo una CIM de 1% para ambas cepas y una CFM $> 16\%$, mientras que en la presente investigación la CIM obtenida para dichas cepas fue similares, es decir 0,75%, pero la CFM fue menor, con un valor de 3,75% para *C. parapsilosis* ATCC 22019 y de 6,26% para *C. krusei* ATCC 6258. Esta diferencia puede deberse a que los investigadores realizaron una tratamiento previo a la ozonización con alcoholes de bajo peso molecular. Otros investigadores han evaluado la actividad de aceites esenciales frente a diferentes géneros de hongos filamentosos como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp y *Rhizopus* spp., obteniendo rangos de CIM entre 1% y 4% [45], mayores que los obtenidos en el presente trabajo, con ambas fracciones del aceite de girasol ozonizado, para hongos filamentosos.

En este trabajo, los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* por microdilución en caldo, empleando el aceite de girasol ozonizado demostró que tanto la fracción oleosa como la acuosa inhiben de manera más efectiva el desarrollo de las especies de *Fusarium* y *Trichophyton rubrum*; mientras que la porción oleosa fue más activa frente a *C. albicans*.

CONCLUSIONES

1. La actividad antifúngica del aceite de girasol aumenta en función del tiempo de ozonización (10, 20, 30 y 180 minutos), adquiriendo ambas fracciones, oleosa y acuosa, actividad antifúngica.
2. De las muestras ozonizadas a diferentes intervalos de tiempos, la que corresponde a 180 minutos (muestra D en proporción aceite/agua 1:1) fue el más activo como antifúngico.
3. El aceite de girasol ozonizado, tanto en su fracción oleosa como acuosa, tiene mayor actividad antifúngica que el aceite de girasol sin ozonizar.
4. *Candida albicans* fue inhibida de forma eficaz por la porción oleosa en comparación a la porción acuosa y al aceite de girasol sin ozonizar.
5. Con las especies de *Fusarium* estudiadas, la fracción oleosa como acuosa del compuesto ozonizado, inhibieron de forma eficaz su desarrollo.
6. La parte acuosa ozonizada mostró actividad antifúngica frente a *Microsporum canis* similar al AGSO, siendo ambos efectivos para inhibir el desarrollo fúngico.
7. La porción acuosa del aceite de girasol ozonizado resultó más eficaz frente a *Trichophyton rubrum*, obteniéndose los valores más bajos de CIM y CFM en relación a los otros hongos evaluados.

RECOMENDACIONES

En estudios futuros sería conveniente ensayar la asociación del aceite de girasol ozonizado, tanto la fracción oleosa como la acuosa, con otros fármacos disponibles en el mercado, para evaluar posibles interacciones de tipo sinérgicas que permitan usar dosis menores con mejor efectividad y reducir el tiempo de tratamiento, entre otros. Asimismo se sugieren trabajos adicionales con el fin de establecer los límites de los parámetros físicos y químicos que se emplean durante el proceso de ozonización de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. Mycology – an update. Part 1: Dermatomycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. Deuts Dermatol Gesells. [Internet] 2013 [citado 03 dic 2015]; 12(3):188–210. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ddg.12245/epdf>.
2. Theos A. Diagnosis and management of Superficial Cutaneous Fungal Infections in Children. Ped Ann. 2007; 36 (1): 47-54.
3. Ghannoum M, Isham N. Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending Story? Plos Path. 2014; 10 (4): 1-5.
4. Gupta A, Ryder J, Chow M, Cooper E. Dermatophytosis: The Management of Fungal Infections. Le Jacq [Internet]. 2005 [citado 29 ago 2015]; 4 (5):305-310. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.15409740.2005.03435.x/pdf>
5. Rashid R, White T. A Foot in the Door for Dermatophyte Research. Plos pathology [Internet]. 2012 [citado 29 ago 2015]; 8(3). Disponible en:
<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.100256>
6. Iwata A, Watanabe Y, Kumagai N, Katafuchi-Nagashima M, Sugiura K, Pillai R et al. *In Vitro* and *In Vivo* Assessment of Dermatophyte Acquired Resistance to Efinaconazole, a Novel Triazole Antifungal. Antimicrob Chemot. 2014; 58(8):4920-4922.

7. Carrillo-Muñoz A, Tur-Tur C, Hernández-Molina J, Santos P, Cárdenas D, Gustavo Giuliano. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev Iberoam Micol.* 2010; 27(2): 49–56.
8. Thomson P, Anticevic S, Rodríguez H, Silva V. Actividad antifúngica y perfil de seguridad del producto natural derivado del aceite de maravilla ozonizado (AMO3) en dermatofitos. *Rev Chil Infect.* 2011; 28 (6): 512-519.
9. Alzate N, López V, Marín H, Murillo A. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. *Rev Tumb.* 2009; 4: 59-71.
10. Foss S, Nakamura C, Dias B, Ueda-Nakamura T, Cortez D, Endo E. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Annals Clin Microb Antimicrob.* 2014, 13: 32.
11. Pinto E, Pina-Vaz C, Gonçalves M, Palmeira A. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 1367–1373.
12. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 1454–1462.

13. Leite M, Froés C, Barcellos M, Assis D, Gonçalves B, Machado L. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. Braz J Microbiol. 2013; 44(4): 1275-1278.
14. Ledesma E, Maniscalchi M, Lemus D. Sinergismo entre ajoeno y ketoconazol en aislamientos de *Microsporum canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF). Rev Iberoam Micol. 2008; 25: 157-162.
15. Yang Mandy (2013). An investigation of the antifungal and antitumor activity of ajoene. Thesis of Master of Biological Sciences no published, University of Canterbury, New Zealand.
16. San-Blas G, Urbina JA, Marchán E, Contreras LM, Sorais F, San-Blas F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. Microbiology. 1997; 143: 1583-1586.
17. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. Hind Publish Corp. Med Inflam. 2010; 2010: 1-9.
18. Menéndez S, Falcón L, Argote M, Méndez I, Fernández D, Elías-Calle B et al. Safety of Topical OLEOZON® in the Treatment of Tinea Pedis: Phase IV Clinical Trial. Internat J of Oz Ther. 2008; 7: 55-59.

19. Martínez- Sánchez G, Perez-Davison G, Horwat R. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. Rev Esp Ozonot. 2012; 2 (1): 121-139.
20. Geweely N. Antifungal Activity of Ozonized Olive oil (Olezone). Intern J of Agric and Biol [Internet]. 2006 [citado 15 dic 2015]. Disponible en: <http://www.ozonterapiklinigi.com/literatur/AntifungalActivityofOzonizedOliveOil.pdf>.
21. Guerrer L, Cunha K, Nogueira M, Cardoso C, Soares M, Almeida M. “*In vitro*” antifungal activity of ozonized sunflower oil on yeasts from onychomycosis. Braz J Microbiol. 2012; 1315-1318.
22. Gupta A, Daigle D, Paquet M, Gandhi B, Simpson F, Villanueva E, Verreault M, Lyons D. Topical treatments for athlete’s foot (Protocol). The Cochrane Library [Internet]. 2013 [citado 12 dic 2015]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD010863/epdf>.
23. Trocoli I, Chryssanthou E. Epidemiology of dermatopyte infections in Stockholm, Sweden: retrospective study from 2005-2009. Med Mycol. 2011; 49:484-488.
24. Bonifáz Trujillo JA. Micología Médica Básica. 4^{ta} ed. México, DF: Mc Graw Hill; 2012.
25. Summerbell R, Cooper E, Bunn U, Jamieson F, Gupta A. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming

- the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol.* 2005; 43:39-59.
26. Balakumar S, Rajan S, Thirunalasundar T, Jeeva S. Antifungal activity of *Aegle marmelos* Correa leaf extract on dermatophytes. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011; 1(4): 309-312.
27. Lora C, Luján M, Robles H, Saravia V, Cabeza J. Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de *Allium sativum* “ajo” frente a dermatofitos y *Candida albicans*. *UCV – Scientia.* 2010; 2 (2): 23-33.
28. Menéndez S, Falcón L, Maqueira Y. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON® in patients suffering from onychomycosis. *Mycoses.* 2011; 54(5): 272-277.
29. Sechi L, Lezcano, Nunez N, Espim M, Dupre I, Pinna A. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J Appl Microbiol.* 2001; 90: 279-284.
30. Moureu S, Violleau F, Haimoud-Lekhal D, Calmon A. Ozonation of sunflower oils: Impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. *Chemist Physics Lipids.* 2015; 186: 79-85.
31. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. 6ta ed. Denver, EE.UU: Médica Panamericana; 2006. Reimpresión 2013.

32. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution. Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungy; Appoved Stardad – Second Edition. Pennsylvania. USA. 2008.
33. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. 2014.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution. Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Appoved Stardad – Third Edition. Pennsylvania. USA. 2008.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution. Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Appoved Stardad – Fourth Informational supplement. Pennsylvania. USA. 2012.
36. Cantón E. y Pemán J. Curvas de letalidad en antifúngicos. Rev Iberoam Micol. 1999; 16: 82-85.
37. Akkus G, Evran M, Gungor D, Karakas M, Sert M. *Tinea pedis* and onicomycosis frecuency in diabetes mellitus patients and diabetic foot ulcers. A cross sectional – observational study. Pak J Med Sci. 2016; 32 (4): 891-5.
38. Mayumi A, Sehn E, Baesso M, Ueda-Nakamura T, Vataru C et al. Antifungal Activity and Nail Permeation of Nail Lacquer Containing *Piper regnellii* (Miq.) C. CD. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae) Leave Extracts and Derivatives. [Internet]. 2009 [citado 12 oct 2016]. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/6/3920>

39. Balakumar S, Rajan S, Thirunalasundari T, Jeeva S, et al. Antifungal activity of *Ocimum sanctum* Linn. (*Lamiaceae*) on clinically isolated dermatophytic fungi. *As Pac J Trop Med*. 2011; 654-657.
40. Njateng G, Du Z, Gatsing D, Nanfack A, Kamdem H, et al. Antifungal properties of a new terpenoid saponin and other compounds from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (*Araliaceae*). *BMC*. 2015; 15 - 25.
41. Tasleem A, Bhosale J, Kumar N, Mandal T, Bendre R, et al. Natural products-antifungal agents derived from plant. *J As Nat Prod Res*. 2009; 7: 621–638.
42. Roemer T, Xu D, Singh S, Parish C, Harrys G, et al. Confronting de challenges of natural product-based antifungal discovery. *Chem Biol*. 2011; 18: 148–164.
43. Díaz M, Gavín J, Ledea O, Hernandez F, Manuel A, et al. Spectroscopic cararterization of ozonated sunflower oil. *Oz Sc Eng*. 2005; 27 (3): 247-253.
44. Zanardi I, Burgassi S, Paccagnini E, Gentile M, Bocci V, et al. What is the best strategy for enhancing the effects of topical applied oils in cutaneous infections? *BioMed Res Inter*. [Internet]. 2009 [citado 12 oct 2016]. Disponible en:
<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/702949/>
45. Leite E, Lima E, Freire K, Paiva C. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Braz Arch Biol Tech*. 2005; 48: 245 – 50.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de compromiso de confidencialidad



Gobierno Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la Salud

Servicio Autónomo Instituto
de Biomedicina Dr. Jacinto Convit

Carta de Compromiso de Confidencialidad

En la presente carta los Investigadores responsables: Lcda. Karla González y Dra. Mireya Mendoza, se comprometen a mantener la confidencialidad de la información de los aislados clínicos obtenidos de pacientes de micosis, los cuales nos han sido suministrados para llevar a cabo el proyecto de investigación "**Actividad antifúngica *in vitro* de aceite de girasol ozonizado en hongos causales de micosis superficiales**", así como la información obtenida de los resultados que surjan con el fin de preservar la integridad y derechos de los sujetos en estudio.

Este compromiso entrará en vigor en el momento en que se inicie los trabajos de investigación en el Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit donde los investigadores del proyecto declaran que están de acuerdo con lo siguiente:

- a) No divulgar a terceras personas o instituciones el contenido de cualquier documentación o información, como parte o resultado del proceso de investigación;
- b) No discutir ni divulgar padecimientos del paciente a terceros, ajenos a la investigación salvo los casos previstos de ruptura de la confidencialidad por requerimiento legal debidamente notariado;
- c) No permitir a terceros el manejo de documentación resultante del proceso de investigación;
- d) No explotar y aprovechar en beneficio propio, o permitir el uso por otros, de las informaciones obtenidas o conocimientos adquiridos durante el proceso de investigación;
- e) No conservar documentación que sea de propiedad del Laboratorio de Micología donde se lleva a cabo el estudio, ni permitir que se realicen copias no autorizadas de dicha información.

En Venezuela, el Código de Bioética y Bioseguridad, 2008 (3ra ed), contempla este ítem, que reproduciré textualmente del Capítulo 2 de la parte II, b2 para el uso de muestras o datos almacenados:

Si las muestras o datos pertenecen a personas que no pueden ser localizadas o si las muestras son de antigua data, el investigador(a) deberá presentar la propuesta ante la Comisión de Bioética de la institución que lo respalda, a fin de que estudie el caso. En estos casos los comités de ética/bioética podrán aprobar la utilización de las muestras o datos sin el consentimiento informado, siempre que se cumplan ciertos requisitos mínimos:

- Que la investigación sea de interés científico relevante.



- Que las muestras sean necesarias para la consecución de los objetivos de la investigación.
- Que no exista evidencia de que el sujeto fuente hubiera manifestado su oposición a la utilización de la muestra.
- Que la investigación no perjudique los intereses del sujeto fuente.

Según lo publicado por Mercedes González Coira en la Revista de Bioética Latinoamericana Volumen 7(1):61-75. /ISSN: 2244-7482 en el año 2011; Titulado: "Aspectos éticos en el manejo de muestras humanas y de ADN", publicación que tomo como referencia para la solicitud ante ustedes de aprobación del trabajo de investigación bajo diseño prospectivo que pretende evaluar resultados obtenidos de la determinación de concentraciones inhibitoria mínimas del aceite de girasol ozonizado en hongos causales de micosis superficiales, con el fin de determinar la actividad antifúngica del compuesto como posible opción terapéutica en micosis superficiales, trabajo que se realizará durante el periodo comprendido entre octubre de 2015 – octubre 2016 con un aproximado de 60 aislados fúngicos obtenidos de muestras clínicas, y debido a la dificultad de contactar a dichos pacientes además de evitar daño psicológico y emocional en estos pacientes o familiares.

Si por algún motivo faltase a cualquiera de mis compromisos, acepto mi responsabilidad por cada uno de mis actos y sus posibles consecuencias.

Caracas, a los 14 días del mes de Julio del 2016.

INVESTIGADOR	CEDULA IDENTIDAD No.	FIRMA
Loda. Karla González	C.I: V-17.037.267	
Dra. Mireya Mendoza	C.I: V-5.314.793	



Anexo 2. Carta de aprobación por el Comité de Bioética

4



Gobierno Bolivariano
de Venezuela

Sistema Público
Nacional de Salud



Caracas, 17 de Agosto de 2016.

Ciudadana
MSc. Maria Mercedes Panizo
Coordinadora Académica
Especialización en Micología Médica

El comité de Ética del Hospital General del Oeste, "Dr. José Gregorio Hernández", ha leído el protocolo del estudio clínico titulado:

**ACTIVIDAD ANTIFUNGICA in vitro DE ACEITE DE GIRASOL
OZONIZADA EN HONGOS CAUSALES DE MICOSIS
SUPERFICIALES**

Considerando que reúne los lineamientos éticos para su realización, ha decidido su aprobación recomendando la información seriada y progresiva de su evaluación.

Atentamente

Por la Comisión de Ética del Hospital General del Oeste.

DRA. MARIA ELENA CORDOVA

